

THÈSES

présentées

a la **Faculté des Sciences**
de l'**Université de Lyon**

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

(Doctorat d'Etat)

par

Robert FONTANGES

PREMIERE THESE

**Contribution à l'étude des rapports entre la Structure
et les Propriétés biologiques des Myxovirus.**

DEUXIÈME THÈSE

**De l'utilisation du Spectre Infrarouge en vue de
l'identification des Microorganismes.**

soutenues le **4 Juin 1965** devant la Commission d'Examen :

M. PERES

Président

M^{elle} GAUTHERON

M. COLOBERT

} Examineurs

THÈSES

présentées

a la **Faculté des Sciences**
de l'**Université de Lyon**

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES
(Doctorat d'Etat)

par

Robert FONTANGES

PREMIERE THESE

**Contribution à l'étude des rapports entre la Structure
et les Propriétés biologiques des Myxovirus.**

DEUXIÈME THÈSE

**De l'utilisation du Spectre Infrarouge en vue de
l'identification des Microorganismes.**

soutenues le **4 Juin 1965** devant la Commission d'Examen :

M. PERES

M^{lle} GAUTHERON

M. COLOBERT

Président

Examineurs



CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES RAPPORTS
ENTRE
LA STRUCTURE ET LES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES
DES
MYXOVIRUS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553406_0015

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires : MM. LONGCHAMBON, DOUIN, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs Honoraires : MM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER,
MOUSSA, JAFFARD, DOUIN, Henri EYRAUD,
DEJARDIN, VIRET.

DOYEN : M. BRACONNIER.

ASSESSEURS : MM. MESNARD, BOIDIN.

PROFESSEURS

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
DUFAY Jean	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale

MM. WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique
TEICHNER	Chimie industrielle
PAVANS DE CECCATTY	Zoologie
MERLIN	Chimie analytique
DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
LUBET	Physiologie
PHILBERT	Physique nucléaire
COHEN - ADAD	Chimie
DAVID Louis	Géologie générale
CHANEL	Psychophysiologie
MAURY	Méthodes mathématiques de la Physique
DEPRAZ	Physique nucléaire
GAUTHIER Jean	Chimie
GAUME	Physique expérimentale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. FERON	Mathématiques
LAFORGUE	Physique
LEGAY	Zoologie expérimentale S.P.C.N.
UZAN	Physique S.P.C.N.
CHENEVOY	Géologie appliquée
GINET	Zoologie

MM. ASCH	Physique
MICHEL Pierre	Minéralogie
DUCET	Biologie végétale
Mle MAITROT	Physique
MM. GEVIN	Géologie générale
PONASSE	Mathématiques
d'INCAN	Physique
LEFEBVRE	Mathématiques
PERNET	Mathématiques
CHERY	Physique
BERGEON	Physique C.S.U.
Mle GAUTHERON	Chimie biologique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ERICSON	Physique générale
MM. MARTEL	Mécanique
MATHIEU	Mécanique des Fluides
ERBEIA	Physique
DESCOTES	Chimie organique
PICARD Philippe	Mathématiques
LEMOIGNE	Botanique
DEMARCO	Géologie générale
MICHEL Georges	Biochimie
LEBRETON	Biologie végétale
DAVID Jean	Biologie animale
TOUSSET	Chimie propédeutique
FEUVRAIS	Physique Electricité
PICARD Claude	Mathématiques
SCHMITT	Physique M.P.C.
LAURENT	Chimie organique
ROT	Mathématiques
BETHOUX	Mathématiques

M^{le} CALAIS
GUSAKOW

Mathématiques
Physique

MAITRE DE CONFERENCES ADJOINT

M. PIERRON

Chimie

CONSEILLER ADMINISTRATIF

M. BURNET

SECRETAIRE PRINCIPAL HONORAIRE

M. ROUX

A V A N T - P R O P O S

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été effectuées au Laboratoire de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, sous la Direction de Monsieur L. Colobert, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Grenoble, Chargé de cours à la Faculté des Sciences de Lyon, Maître de Recherches du Service de Santé des Armées. Pendant sept ans, nous avons été entraînés par le courant impétueux et intrépide qui naît de sa personnalité. Qu'il nous soit permis de lui exprimer toute notre reconnaissance pour la confiance qu'il a bien voulu nous accorder et pour le soin qu'il a pris à notre éducation de biologiste.

Jeune étudiant en Physiologie, nous avons déjà bénéficié de la bienveillante sympathie de Monsieur le Professeur Pérès, Directeur du Laboratoire de Physiologie Générale et Comparée de la Faculté des Sciences de Lyon ; alors Assistant auprès de Monsieur le Professeur Cordier. Nous sommes heureux aujourd'hui de pouvoir lui exprimer notre respectueuse reconnaissance pour avoir bien voulu accepter la présidence du jury d'examen de ce travail.

Nous remercions Mademoiselle le Professeur Gautheron, Professeur de Chimie biologique à la Faculté des Sciences de Lyon, de l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de siéger parmi nos juges.

Nous remercions tous nos camarades et collaborateurs cités au cours de ce travail pour leur aide précieuse qu'ils ont bien voulu nous

concéder.

Enfin, nous exprimons toute notre gratitude au personnel du Laboratoire de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées pour son dévouement enthousiaste et inlassable devant les multiples problèmes que nous lui demandions de résoudre.

I N T R O D U C T I O N

Le concept biochimique de la virologie a poussé nombre de chercheurs à essayer de lier les propriétés biologiques des Myxovirus - capacité d'hémagglutiner, de provoquer l'hémolyse, d'hydrolyser certains glucides, de manifester un pouvoir pathogène - à la présence de constituants chimiques spécifiques dans la particule virale, ou à l'organisation et la structure de cette particule virale.

On sait que Lwoff, Anderson et Jacob (1) ont donné pour la première fois en 1959 une définition claire et précise de ce qu'est l'unité virale fondamentale pour laquelle ils proposent le nom de virion. Cette unité virale fondamentale est un élément structuré et organisé, constitué d'une part d'un acide nucléique (ribonucléique ou désoxyribonucléique) support des propriétés génétiques virales et notamment du pouvoir infectieux, et d'autre part de protéines orientées sur cet acide nucléique tout en l'enveloppant (capside). Ces protéines sont les supports des propriétés antigéniques virales, assurent la stabilité et la résistance au milieu extérieur propre au virion, et commandent la nature des relations entre le virus et la cellule, notamment dans les premières étapes de l'infection

Ce schéma, parfaitement suffisant pour interpréter la structure et les propriétés des petits virus, par exemple celui de la poliomyélite, est tout-à-fait insuffisant pour les virus plus gros et, en particulier, ceux classés dans la catégorie des Myxovirus. En effet, si on trouve ici encore comme constituant chimique un type d'acide nucléique, de l'acide ribonucléique en l'espèce, et des protéines variées antigéniquement distinctes, on trouve en plus des constituants de nature polysidique et de lipides. Il en résulte que la proportion d'acide nucléique par rapport

à l'ensemble des autres constituants est ici très faible : 0,7 à 0,8 pour cent, alors qu'elle est de 25 à 30 p. 100 pour le virus de la poliomyélite par exemple. De même, l'organisation de l'unité morphologique virale ne peut être réduite au schéma primitif de Lwoff, Anderson et Jacob. On se trouve ici en présence de particules de forme et de taille très variées, plastiques, sans symétrie définie, tous caractères qui les opposent au concept du virion type.

En réalité, la désintégration des unités morphologiques virales montre que celles-ci sont constituées d'une part d'une enveloppe externe souple présentant une structure en double couche, la couche externe ayant un aspect palissadique ou spiculé très caractéristique, et d'autre part d'un coeur constitué par le peloton d'un long filament à structure hélicoïdale se fractionnant fréquemment pour donner des bâtonnets plus ou moins longs, relativement rigides, ayant une ressemblance frappante avec les virions de la mosaïque du tabac, ou mieux encore avec ceux du rabougrissement de la tomate *.

L'analyse chimique de ces éléments montre qu'ils sont constitués par de l'acide ribonucléique et par une protéine que l'on peut identifier par ses caractères antigéniques à l'antigène S (soluble) des Immunologistes. On peut donc admettre que ce filament interne présentant une symétrie hélicoïdale régulière correspond au "virion type" tel qu'il a été défini par Lwoff, Anderson et Jacob (1). Si l'on veut réserver le terme de virion à l'unité morphologique élémentaire, on peut réserver celui de "nucléocapside" à ce constituant interne.

* Horne, Waterson, Wildy et Farnham (2), Horne et Waterson (3), Horne et Wildy (4), Waterson et Hurrell (5), techniques de Brenner et Horne (6) au phosphotungstate d'ammonium et de Howatson et Whitmore (7) qui ajoutent une coloration à l'acétate d'uranyle ou à l'hydroxyde de plomb.

Quant à l'enveloppe externe du virion des Myxovirus à la structure palissadique si caractéristique, elle est faite de protéines, de mucoprotéines et de lipides, et possède les antigènes de type V (viral) décrits par les Immunologistes et des antigènes ayant la spécificité de l'hôte dont le virus est issu (souris ou embryon de poulet par exemple).

En toute vraisemblance, les propriétés d'hémagglutiner, d'hémolyser et d'hydrolyser des substrats spécifiques à la manière d'une neuraminidase, doivent être supportés par cette enveloppe externe, mais la démonstration expérimentale s'est révélée extrêmement difficile. Certaines tentatives ont abordé le problème indirectement. Zhdanov, Mekler, Klimenko et Naumava (8) ont montré à l'aide du microscope électronique, que la surface des Myxovirus était constituée par une mosaïque de protéines et de polysaccharides reliés ensemble par des lipides. L'activité hémagglutinante se trouvant diminuée après oxydation périodique, ces auteurs admettent que la molécule support de cette propriété possède un groupement prosthétique polyosidique.

Hoyle, Horne et Waterson (9) ont supposé que l'activité enzymatique est supportée par les éléments palissadiques ou "spicules" longs de 80 à 100 Å, caractéristiques de l'enveloppe externe aussi bien dans les virions globulaires que dans les formes filamenteuses (10). Zhdanov et coll. (8) estiment qu'il n'en est rien, car ils n'ont observé aucune disparition de ces spicules lorsqu'ils détruisent 95 % de l'activité neuraminidasique par l'action de la trypsine sur les virions.

Dans une autre catégorie de travaux, on a tenté de désorganiser les virions et de rechercher les propriétés biologiques parmi les éléments de structure. L'effet de l'éther sur les Myxovirus est connu depuis longtemps et sert à caractériser ce groupe de virus, il détruit en effet le caractère infectieux. Frisch-Niggemeyer et Hoyle en 1956 ont montré que par l'action de l'éther sur le liquide allantoïque infecté on le décompose en trois fractions. L'activité hémagglutinante appartient à l'une d'entre elles qui semblait représenter un état purifié de l'activité enzymatique.

Ce traitement par l'éther a permis à Hosaka, Hosokawa et Fukai (II) puis à Rott, Waterson et Reda (I2) de séparer Myxovirus parainfluenzae I en deux fractions. La première, de constante de sédimentation 90 S, de diamètre 40 à 50 μ se présente sous la forme de rosette sur les microphotographies électroniques d'après Rott, Frank et Schäfer (I3), Hosaka, Nishi et Fukai (I4) et serait responsable des propriétés hémagglutinante et enzymatique. La seconde, de constante de sédimentation 37 S, de diamètre 10 à 20 μ représenterait le matériel génétique.

Il était donc nécessaire pour tenter d'avancer nos connaissances sur la nature chimique des constituants supportant les propriétés biologiques de Myxovirus, de dissocier la particule virale par des procédés physiques ou chimiques afin d'isoler des sous-unités à structure définie, supportant une seule activité biologique. C'est ce que nous avons entrepris, les résultats obtenus faisant l'objet du présent mémoire.

Le matériel viral utilisé comprend d'une part Myxovirus parainfluenzae I caractérisé par son activité hémolytique et par son polymorphisme (Hamar et Rosenberg (I5), Stefanov (I6)), d'autre part, Myxovirus influenzae B (souche Lec) non hémolytique et, plus accessoirement, Myxovirus influenzae des types A (souche PR 8), A_I, A₂.

Nous avons divisé notre mémoire en trois parties. Dans la première nous présentons les techniques que nous avons été appelés à mettre au point. Dans le chapitre I, nous définissons les conditions optimales du développement du virus dans l'oeuf de poule embryonné ; dans le chapitre II nous étudions l'influence d'un inhibiteur existant dans l'oeuf de poule sur le développement du virus ; dans le chapitre III nous étudions les moyens de purification permettant de séparer les virions des Myxovirus ; dans le chapitre IV nous décrivons l'effet de la neuraminidase sur un mucopolysaccharide substrat et dans le chapitre V notre méthode de dosage de cette activité enzymatique . Le chapitre VI est consacré au titrage de l'activité

hémagglutinante par une technique photométrique originale, et le chapitre VII étudie la cinétique de l'hémolyse et le problème du titrage de l'hémolysine.

La deuxième partie fait état des résultats obtenus à l'aide de ces méthodes dans la recherche du support chimique des propriétés biologiques. Dans le chapitre I, nous avons étudié la possibilité d'un rapport entre la capacité d'hémolyser et la présence de lysophosphatides dans les virions. Dans le chapitre II, nous avons présenté le résultat d'expériences d'ultracentrifugation isopycnique destinées à mettre en évidence l'identité possible du principe hémagglutinant et du principe hémolytique. Dans le chapitre III, nous étudions l'identité entre principe hémolytique et principe neuraminidasique par l'effet de la trypsine.

Enfin, dans le chapitre IV, nous étudions les rapports d'identité entre les principes hémagglutinant, hémolytique, neuraminidasique et infectieux à l'aide de différents traitements physiques ou chimiques.

La troisième partie fait la synthèse de ce qui précède pour tenter d'expliquer la nature des supports et leur rôle dans l'infection virale.

Les références bibliographiques sont présentées en deux chapitres, d'une part, dans l'ordre d'arrivée dans le texte, d'autre part, dans l'ordre alphabétique avec numéro de rappel correspondant à l'auteur principal pour lequel le titre de l'article et sa référence sont donnés dans le premier chapitre.

P R E M I E R E P A R T I E

M I S E A U P O I N T

D E S

T E C H N I Q U E S E X P E R I M E N T A L E S

CHAPITRE PREMIER

LE DEVELOPPEMENT DE L'INFECTION A MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I (virus Sendaï) EN OEUF DE POULE EMBRYONNE.

Pour préciser le cycle du développement de Myxovirus parainfluenzae I inoculé dans la cavité allantoïque de l'embryon de poulet, nous avons apporté un soin particulier au contrôle des conditions physiques de l'incubation des oeufs inoculés, notamment en ce qui concerne la température et le degré d'humidité (Fontanges, Garrigue et Colobert (17)).

La multiplication du virus a été suivie par le titrage simultané du pouvoir hémagglutinant, du pouvoir hémolytique, de l'activité neuraminidase et du caractère infectieux du liquide allantoïque.

I - MATERIEL ET METHODES

A - LE VIRUS - Myxovirus parainfluenzae I a été isolé pour la première fois par Kuroya, Ishida et Shiratori (18) en 1953, à Sendaï, au Japon, au cours d'une épidémie de pneumonie du nouveau-né qui conduisait irrémédiablement à la mort avant le sixième jour, dans un tableau dramatique composé d'hyperthermie, de dyspnée et de cyanose de la région nasolabiale (Sano, Niitsu, Nakagawa et Ando (19)).

L'identification du virus Sendaï a été difficile ; pour Fukumi, Nishikawa et Kitayama (20), le virus découvert par Kuroya était le même que celui découvert en 1950 par Nishikawa et Fukumi (21) chez la souris de laboratoire, et dénommé par eux HVM (" Hemagglutinating Virus of Mice").

Pour Sasahara et coll. (22) le virus Sendaï aurait été identifié à un virus antérieurement isolé du porc qui paraissait constituer le réservoir de virus.

La "Japanese Society of Virologists" désigna alors un comité qui proposa pour toutes ces souches le nom de HVJ (" Hemagglutinating Virus of Japan"). Ces travaux conduisirent les immunologistes de nombreux pays à rechercher les anticorps correspondants dans les sérums humains, au cours des épidémies de type grippal (23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36), ce qui permit de mettre en évidence des relations antigéniques avec le virus ourlien, le virus hémadsorbant de type 2 (37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44), le virus hémadsorbant de type I (45), celui de la mononucléose infectieuse (46) et le virus Copenhagen 222 (47).

Devant l'importance de ces réactions croisées que Ishida et coll. (48), Neurath et Zuffa (49) rapportèrent à des antigènes communs, un doute persistait sur l'individualisation du virus, doute qui ne fut levé que par l'isolement de nouvelles souches. Jensen, Minuse et Ackermann (50) aux Etats Unis y parvinrent en 1955, au cours d'une épidémie de type grippal, et proposèrent le nom de virus grippal type D. Le virus fut retrouvé quelque temps après à Bucarest par Tarchila et coll. (51) ; Gorbunova, Gerngross et Gnorizova (52) en isolèrent une nouvelle souche à Vladivostok, tandis que Zhdanov, Ritova et Golygina (53), identifièrent le virus responsable des pneumonies mortelles chez l'enfant comme étant antigéniquement similaire à la souche précédente et à la souche japonaise. Ho et Gorbunova (54) séparèrent 24 souches de ce virus en deux variants sérologiques, un variant " japonais" et un variant " Vladivostok".

Devant ces noms de virus Sendaï, virus D de la grippe, HVJ, NPV (Newborn pneumonitis virus), Andrewes (55,56), qui avait proposé le terme de Myxovirus pour les virus qui possèdent une affinité enzymatique pour certaines mucines, suggéra de le classer sous le nom de Myxovirus parainfluenzae I (57) à côté de virus respiratoires auxquels il donna les noms de M. parainfluenzae II et III. Plus récemment il a proposé de classer ces virus dans le groupe II des Myxovirus (58), à côté de ceux des oreillons, de la maladie de Newcastle et de la rougeole. Cette séparation des Myxovirus en deux catégories, d'après leurs critères biologiques, a une correspondance au point de vue morphologique. Waterson (59, 60) montra que les virions du groupe II étaient de plus grande taille, possédaient moins de spicules à leur périphérie, se rompaient plus facilement et contenaient un peloton de nature ribonucléo-protéinique de diamètre voisin de 180 Å, alors que ceux du groupe I étaient d'un diamètre moitié moindre. Cooper (61) a classé le virus Sendaï dans le groupe des Lipovirus qui se distingue de celui des Clathrovirus par leur contenu en lipides et par leur structure moins rigide en microscopie électronique.

La souche de Myxovirus parainfluenzae I qui a servi à nos expériences est la souche Sendaï 52 provenant initialement de tissu pulmonaire d'un cas mortel de pneumonie du nouveau-né. Isolée par Kuroya (18), puis entretenue sur souris (12 passages), sur rat (1 passage), de nouveau sur souris (1 passage) et enfin sur oeuf embryonné (16 passages), cette souche a été envoyée à l'Université du Michigan par Ishida puis à l'" American Type Culture Collection" * d'où elle nous a été adressée, lyophilisée, au 16ème passage. Après entretien sur oeuf embryonné, nous l'avons utilisée au vingtième passage.

Les caractéristiques du liquide allantoïque infecté étaient alors les suivantes, titre hémagglutinant sur hématies humaines 0 Rh +, 640 unités Hirst ; titre infectieux ($\log_{10}$) 9,2 DI_{50}/ml ; activité neuraminidasi-

* 2112 M Street N.W. - Washington 7 D.C.

que 0,00135 unité ; pouvoir hémolytique 70 %.

B - LES CONDITIONS D'INCUBATION. - Quatre expériences furent réalisées dans les conditions suivantes :

- 1°/ température + 35°C, humidité relative 70 %
- 2°/ température + 35°C, humidité relative 90 %
- 3°/ température + 38°C, humidité relative 90 %
- 4°/ température + 39,5°C, humidité relative 90 %

Les oeufs inoculés furent disposés sur un treillage métallique de manière à être individuellement parfaitement aérés, au nombre d'une centaine environ dans une chambre de 11 m³. Cette chambre, construite spécialement pour cette étude, est calorifugée sur ses six côtés afin d'éviter la formation de rosée et possède, de plus, un sas thermostaté d'entrée. On peut ainsi atteindre 100 % d'humidité relative à des températures réglables de + 30°C à + 40°C.

L'appareil de conditionnement fonctionne en circuit fermé avec appoint de renouvellement d'air pour compenser les fuites. L'air est prélevé dans le sas thermostaté et chauffé à la même température que dans la chambre d'incubation. L'humidification est réalisée par pulvérisation d'eau chaude dans une cellule spéciale chauffée électriquement et pulsion dans la chambre d'incubation.

La régulation électronique est assurée pour la température sèche, à l'aide d'un thermostat indicateur à contact de mercure, agissant sur la batterie de réchauffage. Pour la température humide, elle est assurée à l'aide d'un thermostat humide indicateur à contact de mercure, placé sous courant d'air constant de trois mètres à la seconde, agissant sur l'ensemble pompe de pulvérisation, batterie de préchauffage. L'humidité relative

est calculée d'après les diagrammes de l'air humide, l'intersection des droites représentatives des températures sèches et humides donnant le point figuratif, c'est-à-dire représentant l'état de l'air dont les diverses caractéristiques ont des valeurs physiques bien déterminées (teneur en vapeur d'eau, enthalpie, température de rosée, tension de vapeur). Des contrôles supplémentaires sont effectués au psychromètre mobile sous courant d'air constant.

C - LES METHODES DE TITRAGE. - Pour chaque expérience, cent oeufs embryonnés (poules Sussex) sont inoculés avec 0,1 ml d'une dilution 1.10^{-3} du liquide allantoïque infecté provenant du vingtième passage de la souche Sendaï 52.

Toutes les douze heures, pendant cent-vingt heures, dix oeufs sont prélevés, mirés pour distinguer les embryons vivants, puis placés à la température de + 4°C pendant six heures au moins. Après récolte des liquides allantoïques et contrôle de l'absence de souillure bactérienne, chaque série de dix oeufs est rassemblée et les liquides allantoïques mélangés. Après centrifugation à faible vitesse (5000 g, 10 minutes), les réactions suivantes ont été effectuées sur chaque mélange de liquides allantoïques.

1) Hémagglutination. - Méthode des dilutions en tubes avec lecture directe, suspension d'hématies 0 Rh + à 0,5 % en solution de chlorure de sodium à 9 g pour 1000.

Les résultats sont donnés en Unités Hirst, c'est-à-dire par l'inverse de la dilution la plus haute qui produit encore le phénomène d'hémagglutination.

2) Titre infectieux. - Chaque échantillon de liquide allantoïque a été inoculé pur, puis à des dilutions géométriques d'ordre -10 allant jusqu'à 10^{-12} , chaque dilution étant inoculée à 10 embryons de poulet âgés de 9 jours. Après 48 heures d'incubation à la température de +35°C et pour

90 % d'humidité relative, les liquides allantoïques sont récoltés et le titre hémagglutinant déterminé.

Le titre infectieux exprimé en DI_{50} a été calculé à l'aide de la méthode des totaux cumulatifs de Reed et Muench (62) suivie de la technique graphique sur papier log-probit de Bonet-Maury (63). Les limites de confiance FD sont établies d'après la formule donnée par ces auteurs. Les résultats sont exprimés en DI_{50} par ml, ou plus souvent encore, par leur logarithme décimal ; par exemple, si un millilitre de la dilution $10^{-8,2}$ contient une dose infectieuse 50 p. 100, le titre infectieux du liquide allantoïque correspondant non dilué, est de $10^{8,2}$ /ml ou encore de 8,2.

On a été amené à calculer le rapport, titre infectieux, titre hémagglutinant (DI_{50}/HA), chacun de ces titres étant respectivement exprimé en DI_{50} et en Unités Hirst.

3) Titrage de l'activité enzymatique. - Le substrat est l'acide 3' lactose-lactaminique isolé du colostrum de vache et purifié par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 en N butanol/pyridine/eau, 3 : 2 : 1,5 suivant Mathieu, Colobert, Creach et Fontanges (64). L'hydrolyse enzymatique est réalisée à la température de + 37°C, par addition de 0,25 ml de liquide allantoïque infecté, à 250 µg de substrat dissous dans 1 ml de tampon cacodylate de pH 5,6. La vitesse initiale est déterminée par dosage de l'acide lactaminique libéré, à l'aide de la méthode colorimétrique de Warren (65), aux temps de 30 secondes, 2, 4, 6, et 10 minutes.

La quantité q d'acide lactaminique libéré à chaque prélèvement est calculée à partir de la densité optique d de la coloration obtenue suivant la formule de Warren :

$$q \text{ (micromoles)} = 0,075 \times d$$

La vitesse initiale en micromoles d'acide lactaminique libéré par minute exprime l'activité enzymatique.

4) Titrage du pouvoir hémolytique. - Nous avons exprimé le titre hémolytique par le pourcentage d'hémolyse observé après trente minutes de contact à la température de + 37°C, de 0,5 ml de liquide allantoïque dilué au 1/5 dans une solution tamponnée isotonique, avec 4,5 ml d'une suspension à 1 p. 100 du culot de centrifugation d'hématies humaines O Rh +.

Les détails des méthodes de titrage des pouvoirs enzymatique et hémolytique font respectivement l'objet des chapitres cinquième et septième.

II - RESULTATS

A - INFLUENCE DU DEGRE HYGROMETRIQUE PENDANT L'INCUBATION. - Le développement du virus a été suivi à la température de + 35°C dans des conditions d'humidité relative, d'une part de 70 %, d'autre part de 90 %.

Dans le premier cas (70 % d'humidité relative), comme le montre le tableau I, le titre infectieux s'élève très rapidement et atteint 4,70 DI_{50}/ml douze heures après l'inoculation. Il augmente rapidement jusqu'à une valeur maximale comprise entre 8,5 et 9,5 DI_{50}/ml , qu'il atteint en 36 à 48 heures environ, et ce titre se maintient constant jusqu'à la 120 ème heure environ. Les activités hémagglutinante, neuraminidasique et hémolytique se développent très sensiblement d'une manière parallèle au titre infectieux.

L'augmentation de l'humidité relative (tableau II), n'entraîne pas de modification notable. Le titre infectieux maximal atteint est très sensiblement le même que dans le cas précédent et, si l'on tient compte du fait qu'au moment de la récolte le volume total du liquide allantoïque infecté est beaucoup plus grand du fait de la diminution de l'évaporation à travers la coquille, la production globale de virus est peut-être même supérieure. Les activités enzymatique et hémolytique sont également un peu plus élevées que dans le premier cas.

Moment du prélèvement (heures)	Titre hémagglutinant (unités Hirst)	Titre infectieux (DI ₅₀ /ml)	Rapport du titre infectieux au titre hémagglutinant	Activité neuraminidasi- que (unités conventionnelles)	Activité hémolytique (en %)
12	0	$10^{4,70} \pm 0,48$		0	0
24	20	$10^{6,89} \pm 0,52$	$10^{5,59} \pm 0,52$	0,00015	2
36	640	$10^{9,16} \pm 0,52$	$10^{6,35} \pm 0,52$	0,00037	6,6
48	1280	$10^{8,75} \pm 0,38$	$10^{5,64} \pm 0,38$	0,00075	37,3
60	1280	$10^{9,35} \pm 0,43$	$10^{6,24} \pm 0,43$	0,00135	50,6
72	1280	$10^{9,40} \pm 0,48$	$10^{6,29} \pm 0,48$	0,00157	77,3
84	1280	$10^{8,58} \pm 0,35$	$10^{5,47} \pm 0,35$	0,00157	84
96	1280	$10^{8,30} \pm 0,40$	$10^{5,19} \pm 0,40$	0,00165	84
108	640	$10^{8,53} \pm 0,28$	$10^{5,72} \pm 0,28$	0,00190	66,6
120	640	$10^{8,53} \pm 0,41$	$10^{5,72} \pm 0,40$	0,00165	57,3

Tableau I - Développement de Myxovirus parainfluenzae I à la température de + 35°
et pour une humidité relative de 70 %.

Moment du prélèvement (heures)	Titre hémagglutinant (unités Hirst)	Titre infectieux (DI ₅₀ / ml)	Rapport du titre infectieux au titre hémagglutinant	Activité neuraminidase (unités conven- tionnelles)	Activité hémolytique (en %)
12	0	$10^{5,52} \pm 0,28$		0	0
24	80	$10^{8,31} \pm 0,36$	$10^{6,41} \pm 0,36$	0,00037	0
36	640	$10^{9,30} \pm 0,45$	$10^{6,50} \pm 0,44$	0,00052	32
48	1280	$10^{8,83} \pm 0,40$	$10^{5,72} \pm 0,40$	0,00150	61
60	1280	$10^{8,70} \pm 0,30$	$10^{5,59} \pm 0,30$	0,00270	94
72	1280	$10^{9,70} \pm 0,46$	$10^{6,59} \pm 0,40$	0,00270	97
84	1280	$10^{8,70} \pm 0,43$	$10^{5,59} \pm 0,43$	0,00270	96
96	640	$10^{8,40} \pm 0,28$	$10^{5,60} \pm 0,28$	0,00165	92
108	1280	$10^{8,68} \pm 0,50$	$10^{5,59} \pm 0,50$	0,00165	96
120	1280	$10^{8,46} \pm 0,51$	$10^{5,35} \pm 0,51$	0,00165	89

Tableau II - Développement de Myxovirus parainfluenzae I à la température de + 35°C
et pour une humidité relative de 90%.

B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION. - L'influence de la température d'incubation a été étudiée dans les conditions d'humidité relative de 90 %, à trois températures différentes, + 35, + 38 et + 39,5°C.

La comparaison des tableaux II, III et IV, montre que l'élévation de la température a pour effet de diminuer nettement la valeur maximale du titre infectieux du liquide allantoïque (de l'ordre d'une puissance de 10), et de retarder la montée de ce titre. Les activités agglutinante, neurominidase et hémolytique sont très diminuées, mais elles demeurent en gros, parallèles aux variations du titre infectieux.

Quand la température atteint + 39,5 °C, on constate que, contrairement à ce qui s'observe dans les autres cas, de nombreux embryons meurent ; ceci commence vers la 60ème heure, et en moyenne on constate qu'à la 120ème heure, 50 % des embryons sont morts.

III - DISCUSSION

La comparaison des résultats ne peut se faire qu'en tenant compte de la précision des méthodes utilisées. La figure I représente la variation du titre infectieux en fonction de la durée d'incubation, dans les diverses conditions de température et d'humidité. Sur cette figure ont été chaque fois portées les limites de confiance supérieures et inférieures, calculées suivant Bonet-Maury et coll. (63). Toutes les zones ainsi délimitées ont entre elles une zone commune (hachurée sur la figure) sauf dans le cas où les conditions de + 39,5° et 90 % d'humidité relative sont réalisées. On en conclut, exception faite pour la période s'étendant entre la 55ème et la 80ème heure, qu'il n'y a pas 96 % de chance que les différences observées soient significatives. En revanche, l'examen de la zone commune met en évidence une tendance à une diminution progressive du titre moyen depuis la 30ème heure environ jusqu'à la 120ème. C'est entre 30 et 48 heures, et vraisemblablement vers la 36ème heure, que le titre infectieux atteint son maximum.

Moment du prélèvement (heures)	Titre hémagglutinant (unités Hirst)	Titre infectieux (DI ₅₀ /ml)	Rapport du titre infectieux au titre hémagglutinant	Activité neuraminidase (unités con- ventionnelles)	Activité hémolytique (en %)
12	0	$10^{4,7 \pm 0,45}$		0	0
24	0	$10^{7,22 \pm 0,30}$		0	I
36	320	$10^{8,52 \pm 0,28}$	$10^{5,96 \pm 0,28}$	0,00037	5
48	320	$10^{8,52 \pm 0,48}$	$10^{5,96 \pm 0,48}$	0,00075	12
60	640	$10^{8,16 \pm 0,49}$	$10^{5,35 \pm 0,49}$	0,00184	20
72	640	$10^{8,16 \pm 0,60}$	$10^{5,35 \pm 0,60}$	0,00228	31
84	1280	$10^{8,52 \pm 0,30}$	$10^{5,41 \pm 0,30}$	0,00311	30
96	640	$10^{7,82 \pm 0,49}$	$10^{5,01 \pm 0,49}$	0,00273	29
108	1280	$10^{8,53 \pm 0,32}$	$10^{5,42 \pm 0,32}$	0,00275	23
120	640	$10^{8,16 \pm 0,48}$	$10^{5,35 \pm 0,48}$	0,00300	18

Tableau III - Développement de Myxovirus parainfluenzae I à la température de + 38°C
et pour une humidité relative de 90 %.

Moment du prélèvement (heures)	Titre hémagglutinant (unités Hirst)	Titre infectieux (DI ₅₀ /ml)	Rapport du titre infectieux au titre hémagglutinant	Activité neuraminidasi- que (unités conventionnelles)	Activité hémolytique (en %)
12	0	10 ^{2,62} ± 0,36		0	0
24	0	10 ^{3,30} ± 0,40		0	0
36	0	10 ^{6,55} ± 0,29		0	0
48	0	10 ^{6,52} ± 0,28		0	0
60	160	10 ^{7,00} ± 0,58	10 ^{4,80} ± 0,58	0,00090	4
72	160	10 ^{7,46} ± 0,28	10 ^{5,26} ± 0,28	0,00090	16
84	320	10 ^{7,83} ± 0,61	10 ^{5,27} ± 0,61	0,00247	52
96	320	10 ^{7,33} ± 0,49	10 ^{4,77} ± 0,49	0,00225	48
108	320	10 ^{6,75} ± 0,64	10 ^{4,19} ± 0,64	0,00245	52
120	40	10 ^{6,52} ± 0,39	10 ^{4,92} ± 0,39	0,00052	5

Tableau IV - Développement de Myxovirus parainfluenzae I à la température de + 39,5 °C et pour une humidité relative de 90%.

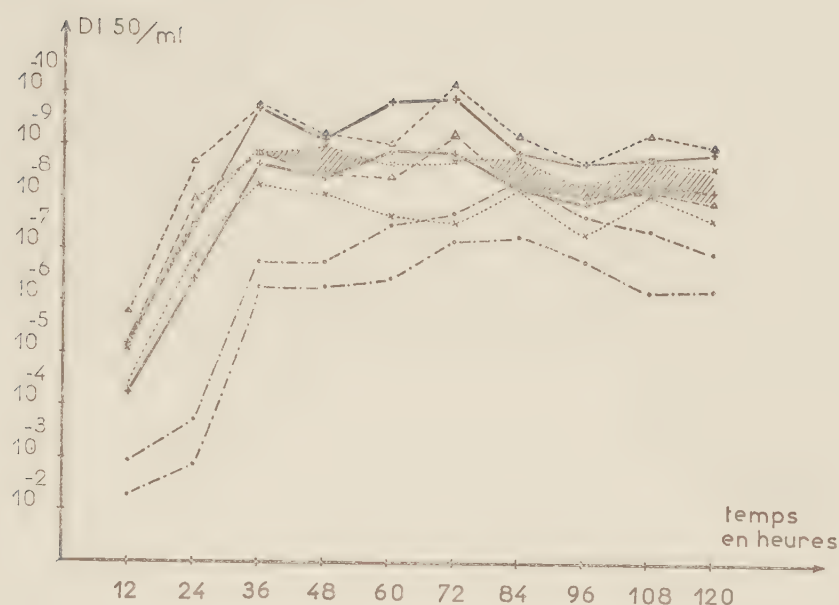


FIG. I.- Variations du titre infectieux en fonction de la durée d'incubation dans les conditions de température et d'hygrométrie variables, entre les limites de confiance (fD) supérieure et inférieure ; — + — + — ; 35 ° et 70 p. I00 d'humidité relative ; -△ - - - △ - ; 35 ° et 90 p. I00 d'humidité relative ; ..x.....x.....; 38° et 90 p. I00 d'humidité relative ; — . — . — . — . — ; 39,5° et 90 p. I00 d'humidité relative.

La variation du rapport entre le titre infectieux et le titre hémagglutinant est mis en évidence par la figure 2. On observe que, compte tenu de la précision des méthodes de titrage, les variations observées d'une expérience à l'autre, c'est-à-dire dans des conditions de température et d'humidité différentes, ne sont pas significatives. En revanche, la valeur du rapport tend à baisser légèrement quand la durée d'incubation se prolonge, ce qui peut s'interpréter par la notion classique de la plus grande labilité du pouvoir infectieux.

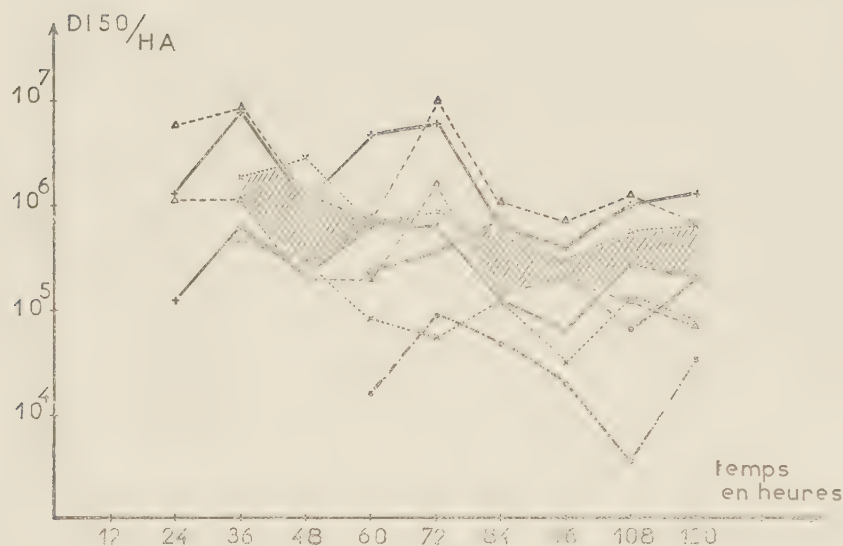


FIG. 2. - Variations du rapport entre le titre infectieux et le titre agglutinant en fonction de la durée d'incubation entre les limites de confiance (fD) supérieure et inférieure (mêmes conventions que pour la figure I).

La figure 3 met en évidence les variations moyennes, du titre infectieux, de l'activité hémolytique, de l'activité hémagglutinante et de l'activité neuraminidasique en fonction de la durée d'incubation à la température de $+35^{\circ}\text{C}$ et pour une humidité relative de 70 %. On note un excellent parallélisme de ces valeurs, ce qui permet de conclure que la particule virale demeure identique à elle-même pendant une longue période et depuis le début du développement du virus. Tardivement, le caractère infectieux et le pouvoir enzymatique fléchissent, ce qui traduit une certaine altération des particules virales.

Le fait qu'aucune dissociation ne se manifeste entre le pouvoir hémolytique et les autres propriétés conduit déjà à penser que le caractère hémolytique appartient à la particule elle-même.

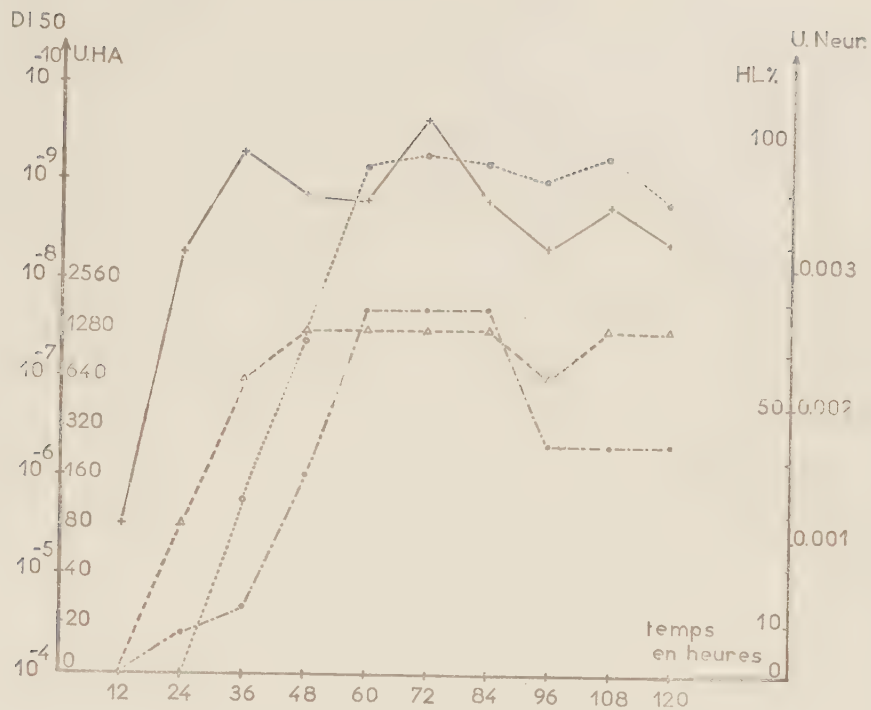


FIG. 3. - Variations du titre infectieux, du titre hémagglutinant, de l'activité neuraminidasique et de l'activité hémolytique en fonction de la durée d'incubation à 35°C et 70 p. 100 d'humidité relative --+---+--- ; titre infectieux ; ----- Δ -----: titre hémagglutinant ; — . — . — . — : activité neuraminidasique ; ----o----o----o----: activité hémolytique.

La mortalité qui se manifeste chez les embryons inoculés lorsque la température est élevée à + 39,5°C est un phénomène intéressant qui peut être rapproché des observations faites par Lwoff (66,67) sur l'influence de la température sur le développement viral et l'effet cytopathogène.

* *
*

Le développement de la souche Sendaï 52 dans la cavité allantoïque de l'embryon de poulet de 9 jours a été étudié par le titrage simultané du pouvoir hémagglutinant, du pouvoir hémolytique, de l'activité neuraminidase et du titre infectieux, dans des conditions particulièrement précises de température et de degré hygrométrique. Il en résulte que les particules virales sont identiques à elles-mêmes depuis le début du cycle de développement et le demeurent très longtemps. La production maximale de virus est obtenue par incubation de soixante-douze heures à 35°C, avec une humidité relative de 90 p. 100 ; mais la concentration en virus est déjà considérable et proche de la valeur maximale dès la quarante-huitième heure.

CHAPITRE DEUXIEME

INTERFERENCE D'UN INHIBITEUR AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE MYXOVIRUS PARAIN- FLUENZAE I EN OEUF DE POULE EMBRYONNE

Ayant été amenés à inoculer des embryons de poulet dans le courant du onzième jour d'incubation, nous avons constaté lors de la récolte après quarante-huit heures d'incubation supplémentaire à la température de + 35°C, que les titres hémagglutinant et hémolytique des liquides allantoïques étaient faibles ou nuls.

On sait, depuis les travaux de Svedmyr (68), de Hardy et Horsfall (69) sur Myxovirus influenzae A, souche PR 8, ceux de Cunha et coll. (70), de Lanni et Beard (71) sur le virus de la maladie de Newcastle, de Chu et Morgan (72) sur celui des oreillons, que des inhibiteurs de l'hémagglutination apparaissent dans le liquide allantoïque au douzième jour d'incubation.

Nous avons voulu déterminer la date exacte de l'apparition éventuelle de cet inhibiteur dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I et rechercher, par des épreuves d'inactivation, si l'inhibiteur de l'hémolyse d'une part et celui de l'hémagglutination d'autre part, sont ou non des substances distinctes (Colobert et Fontanges (73)).

I. TECHNIQUES

A - TITRAGE DU POUVOIR INHIBITEUR DE L'HEMOLYSE. - Pour mettre en évidence un inhibiteur éventuel, nous nous sommes servis, comme système de référence, d'un mélange de liquides allantoïques infectés de titre hémolytique

connu. Après avoir réalisé les mélanges indiqués dans le tableau V, les tubes à essais sont plongés dans un thermostat réglé à la température de + 37°C. Au bout de deux heures on détermine la quantité d'hémoglobine libérée, comme il est indiqué dans l'exposé détaillé de la méthode de titrage du pouvoir hémolytique au chapitre septième.

Système hémolytique de référence	Hématies humaines 0 Rh+ à I p. 100	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	Liquide allantoïque hémolytique	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Système de l'inhibiteur	Liquide embryonnaire contenant l'inhibi- teur	0	0,2	0,4	0,6	0,8
	Tampon de dilution (pH 7,4)	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Dilution finale de l'inhibiteur		2/55	4/55	6/55	8/55	

Tableau V - Titrage du pouvoir inhibiteur de l'hémolyse.

La différence entre le pourcentage d'hémolyse obtenue sans inhibiteur, et le pourcentage d'hémolyse obtenue en présence d'inhibiteur, constitue une mesure de l'activité de ce dernier. En effet, nous avons constaté qu'il y a proportionnalité entre cette valeur et la concentration d'inhibiteur utilisée, quelle que soit la concentration du système hémolytique de référence (fig. 4) et que les cinétiques de l'hémolyse, en présence ou en l'absence d'inhibiteur (fig. 5) sont très voisines.

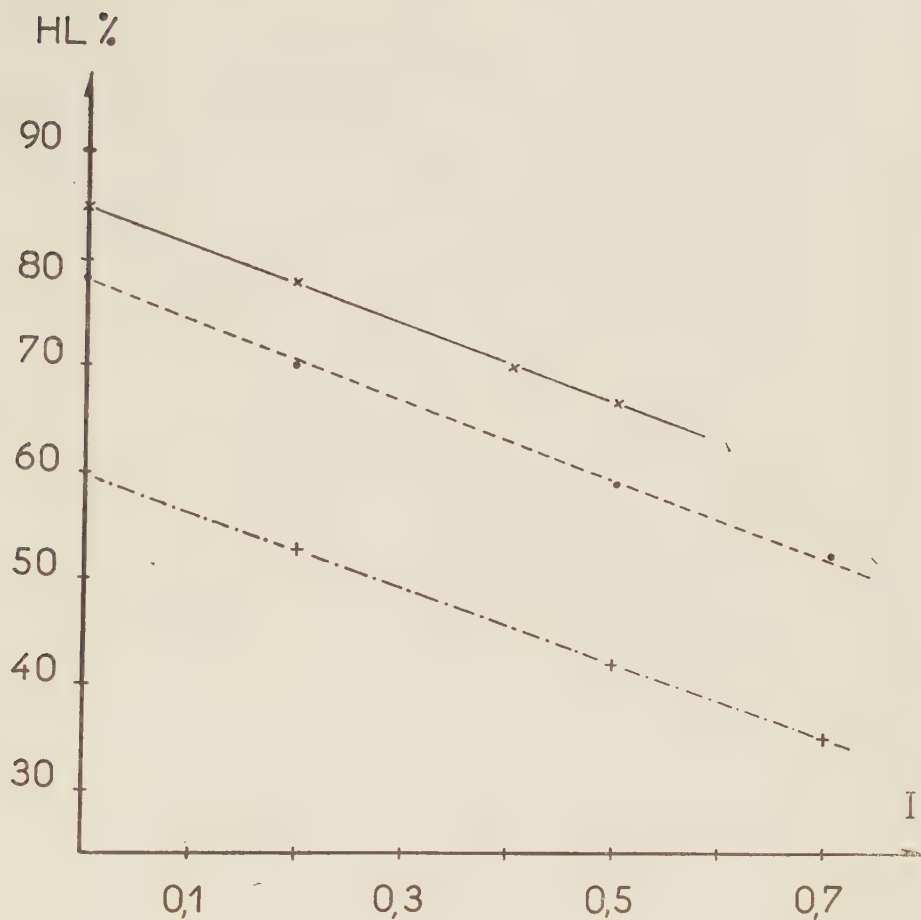


FIG. 4 - Influence de la quantité d'inhibiteur I introduit dans la réaction, exprimée en ml de liquide allantoïque non inoculé au 13^{ème} jour d'incubation, sur l'activité hémolytique exprimée en pourcentage d'hémolyse, pour des concentrations différentes de virus (dilutions finales du liquide allantoïque hémolytique) :

A = 6/55

B = 4/55

C = 2/55

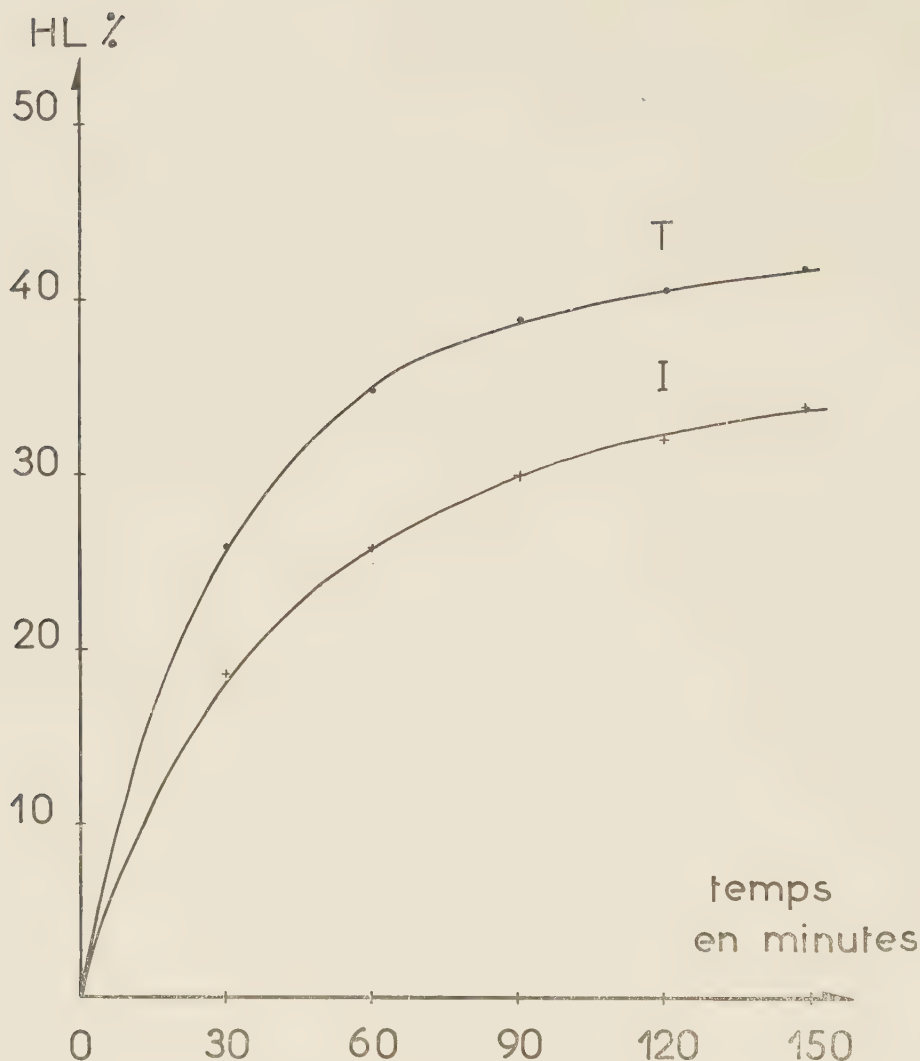


FIG. 5 - Cinétique de l'hémolyse, en présence (I) ou en l'absence d'inhibiteur (T)

B - TITRAGE DU POUVOIR INHIBITEUR DE L'HEMAGGLUTINATION. - Le pouvoir hémagglutinant et le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination ont été déterminés sur des hématies humaines O Rh+, à la température de + 4°C, suivant les techniques de Hirst, avec les modalités opératoires préconisées par Lépine et Sohier (74). Pour titrer le pouvoir d'inhibition de l'hémagglutination, on opère de la façon suivante.

Dans des tubes à hémolyse, on introduit 0,25 ml d'une série de dilutions de la solution d'inhibiteur (liquide allantoïque d'un embryon de 13 jours par exemple). On ajoute alors 4 Unités hémagglutinantes de Myxovirus parainfluenzae I sous le volume de 0,25 ml. Après vingt minutes de repos à la température du laboratoire, on ajoute 0,5 ml d'une suspension d'hématies à 0,5 p. 100. On lit les résultats dès que la sédimentation des hématies est achevée (tableau VI).

	I	2	3	4	5	6	7	8	T
Solution de Na Cl à 9g p. 1000	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Liquide allantoïque inhibiteur	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Liquide allantoïque inoculé (4 U.H.A)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-
20 minutes à la température du laboratoire									
Suspension d'hématies à 0,5 %	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

Tableau VI - Titrage du pouvoir inhibiteur de l'hémagglutination

La valeur de la dilution la plus élevée de la solution d'inhibiteur qui inhibe totalement l'hémagglutination, est prise comme mesure de la capacité inhibitrice.

On a également utilisé la méthode sur plaques, en mettant en présence IV gouttes de dilution d'inhibiteur avec II gouttes de liquide allantoïque renfermant 4 U.H.A, puis II gouttes de suspension globulaire à 2 p. 100. Les résultats sont identiques.

C - EMPLOI DU R.D.E. POUR DETRUIRE LES INHIBITEURS.- Le R.D.E.* est préparé de la manière suivante. On inocule dans la cavité allantoïque d'embryons de poulet de II jours, 0,1 ml de la dilution à 10^{-3} d'une culture de dix heures à la température de + 37°C en bouillon ordinaire, de Vibrio cholerae (souche 4Z). Après une incubation de seize heures à + 37°C, les liquides allantoïques sont prélevés, centrifugés à 5000 g pendant 15 minutes, puis filtrés sur membrane Co₅. Après vérification de la stérilité et de l'activité, le filtrat est utilisé directement suivant les modalités préconisées par Davoli (75) (tableau VII).

Après quatorze à seize heures d'incubation du mélange de l'inhibiteur et du R.D.E. en présence de calcium, on inhibe l'enzyme par addition de citrate de sodium en solution saturée et chauffage à la température de + 56°C. On titre alors l'activité inhibitrice de l'hémagglutination ou de l'hémolyse suivant les méthodes que nous venons de décrire.

D - EMPLOI DE LA TRYPSINE POUR DETRUIRE LES INHIBITEURS. - La trypsine employée est celle de l'Institut Pasteur **. Elle a été utilisée aux concentrations finales de 1,25 et de 0,625 mg/ml dans le liquide allantoïque contenant l'inhibiteur. Après 3 heures d'incubation à la température de + 37°C, l'épreuve de l'inhibition de l'hémagglutination ou de l'hémolyse est pratiquée directement.

E - EMPLOI DU PERIODATE POUR DETRUIRE LES INHIBITEURS. - A une dilution au demi dans du tampon phosphate 0,066 M de pH 7, des liquides embryonnaires contenant des inhibiteurs, on ajoute un volume égal d'une solution aqueuse de periodate de potassium à 0,5 g pour 100 ml, préparée 24 h. auparavant.

Après avoir abandonné le mélange vingt minutes à la température du laboratoire, on ajoute un volume égal d'une solution de glucose à 10 g pour

* R.D.E. : Receptor - Destroying - Enzyme.

** trypsine purifiée, Serpateur, 25, rue du Docteur Roux - PARIS -

100 ml d'eau salée à 0,9 g pour 100 ml. Vingt minutes plus tard, le titre inhibiteur de l'héماغglutination est éprouvé comparativement à celui du même liquide embryonnaire ayant subi les mêmes opérations, mais pour lequel la solution de periodate a été remplacée par de l'eau (tableau VIII).

	Epreuve	Contrôle
Soluté isotonique de Chlorure de sodium (ml)	0	0,6
Solution tamponnée d'acétate de calcium (I)	0,1	0,1
Solution contenant l'inhibiteur à détruire	0,1	0,1
R.D.E.	0,6	0
Pénicilline (0,05 ml)	20 U.	20 U.
37° pendant 14 - 16 h.		
Solution saturée de Citrate de sodium	0,005	0,005
56° pendant 30 minutes Dilution résultante de l'inhibiteur 1/8		
(I) Acétate de sodium 0,2 M : 9,5 ml. Acide acétique 0,2 M : 0,5 ml. On ajoute 1 ml d'une solution de chlorure de calcium à 1 p. 100 (pH 6).		

Tableau VII - Mode d'emploi du R.D.E. pour détruire les inhibiteurs.

	Epreuve	Contrôle
Liquide allantoïque dilué au 1/2	I vol.	I vol.
KIO ₄ à 0,5 %	I vol.	0
eau distillée	0	I vol.
20 minutes, température du laboratoire		
Glucose 10 % en solution saline à 0,9%	2 vol.	2 vol.
20 minutes, température du laboratoire		

Tableau VIII - Modalité d'emploi du periodate de potassium
comme destructeur des inhibiteurs.

F - ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LES INHIBITEURS. - Le liquide allantoïque contenant l'inhibiteur est chauffé pendant une heure à la température de + 65°C avant d'être mis en contact avec les différents éléments des réactions de titrage du pouvoir inhibiteur.

II - R E S U L T A T S

A - MISE EN EVIDENCE D'INHIBITEURS DANS LES LIQUIDES EMBRYONNAIRES EN FONCTION DE L'AGE DES EMBRYONS. - Il est facile de mettre en évidence ces inhibiteurs dans le cas du virus Sendaï, encore que leur concentration paraisse très variable d'un embryon à un autre et semble présenter une certaine périodicité saisonnière.

Des lots d'embryons de poulet respectivement au septième, huitième, neuvième, dixième, onzième et douzième jour d'incubation à + 39°C, sont

incubés pendant quarante-huit heures à + 35°C sans être inoculés. A ce moment, c'est-à-dire après une incubation totale respective de neuf, dix, onze, douze, treize et quatorze jours, on recueille séparément le liquide amniotique et le liquide allantoïque de chacun des embryons. On titre alors le pouvoir d'inhibition de l'hémolyse et de l'héماغglutination. Les résultats apparaissent dans le tableau IX. On voit qu'un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'héماغglutination et de l'hémolyse apparaît au onzième jour dans les liquides embryonnaires.

Si on opère sur des embryons inoculés avec le virus Sendaï respectivement au septième, huitième, neuvième, dixième, onzième et douzième jour d'incubation à + 39°C, puis incubés deux jours à + 35°C, on constate que les titres héماغglutinants des liquides allantoïques sont plus élevés pour les oeufs inoculés au neuvième jour que pour ceux inoculés plus tardivement. Si l'inoculation est faite au onzième ou douzième jour, les titres héماغglutinants et héमolytiques observés sont très bas et souvent nuls. On a vérifié que, dans ce dernier cas, les liquides amniotiques et allantoïques contiennent des titres très élevés d'inhibiteurs de l'hémolyse et de l'héماغglutination.

B - EFFET DE LA TEMPERATURE, DU PERIODATE, DU R.D.E., DE LA TRYPSINE SUR LES PROPRIETES D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION. - L'étude systématique de ces différents facteurs montre que l'inhibiteur contenu dans un liquide allantoïque non infecté, au 13ème jour d'incubation, résiste à un chauffage d'une heure à la température de + 65°C, mais se trouve détruit par le periodate, le R.D.E. et la trypsine (tableau X).

C - EFFET DE LA TEMPERATURE, DU PERIODATE, DU R.D.E., DE LA TRYPSINE SUR LES PROPRIETES D'INHIBITION DE L'HEMOLYSE. - Nous retrouvons des résultats identiques en ce qui concerne l'action de la température, du periodate (fig. 6) et du R.D.E. sur l'inhibiteur de l'hémolyse, mais l'effet de la trypsine n'a pu être mis en évidence, car elle inhibe elle-même les propriétés héमolytiques de Myxovirus parainfluenzae I, comme nous le verrons au cours du chapitre troisième, IIème partie.

Age des embryons au moment de l'inoculation	Age des embryons au moment de la récolte des liquides embryonnaires	Nature du liquide embryonnaire étudié : AM: amniotique AL:allantoïque	Concentration de l'inhibiteur de l'hémagglutination sur un lot de 4oeufs				Concentration de l'inhibiteur de l'hémolyse sur le même lot de 4oeufs			
			1er oeuf	2ème oeuf	3ème oeuf	4ème oeuf	1er oeuf	2ème oeuf	3ème oeuf	4ème oeuf
7 jours	9 jours	AL	0	0	0	0	0	0	0	0
		AM	0	0	0	0	0	0	0	0
8 jours	10 jours	AL	0	0	0	0	0	15	84	-
		AM	0	0	0	0	0	6	22	-
9 jours	11 jours	AL	1/8	1/16	1/8	1/16	-	100	81	100
		AM	0	1/8	0	1/8	15	-	25	40
10 jours	12 jours	AL	1/16	1/4	1/8	1/8	100	87	75	62
		AM	1/64	1/16	1/4	1/4	100	62	56	100
11 jours	13 jours	AL	1/8	1/8	1/4	1/32	87	75	56	69
		AM	1/64	1/64	1/16	1/8	62	81	-	50
12 jours	14 jours	AL	1/8	1/4	1/16	1/32	87	75	62	87
		AM	1/32	1/16	1/64	1/16	50	75	62	87

Tableau IX - Mise en évidence d'inhibiteurs dans les liquides embryonnaires en fonction de l'âge des embryons

(La mesure de la capacité inhibitrice est donnée, d'une part par la valeur de la dilution la plus élevée de la solution d'inhibiteur qui inhibe totalement l'hémagglutination et, d'autre part, par la différence entre le pourcentage d'hémolyse obtenue sans inhibiteur et le pourcentage d'hémolyse obtenue en présence d'inhibiteur).

Dilution finale	I/32	I/64	I/128	I/256	I/512	I/1024	I/2048	I/4096	T
Liquide all. I	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Liquide all. II	-	-	-	-	-	-	+	+	-
I + periodate	+	+	+	+	+	+	+	+	-
II + Periodate	+	+	+	+	+	+	+	+	-
I. 65°C I heure	-	-	+	+	+	+	+	+	-
II. 65°C I heure	-	-	-	-	-	-	+	+	-
I + R.D.E.	+	+	+	+	+	+	+	+	-
II + R. D.E.	+	+	+	+	+	+	+	+	-
I + Trypsine	+	+	+	+	+	+	+	+	-
II + Trypsine	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Témoin Antigène	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tableau X - Effet du périodate, de la température, du R.D.E., de la trypsine sur les propriétés d'inhibition de l'hémagglutination de deux liquides allantoïques, I (titre inhibiteur I/64) et II (titre inhibiteur I/1024),

T, témoin avec inhibiteur non traité,

Témoin Antigène, témoin sans inhibiteur, contenant 4 unités Hémagglutinantes Hirst dans 0,25 ml.

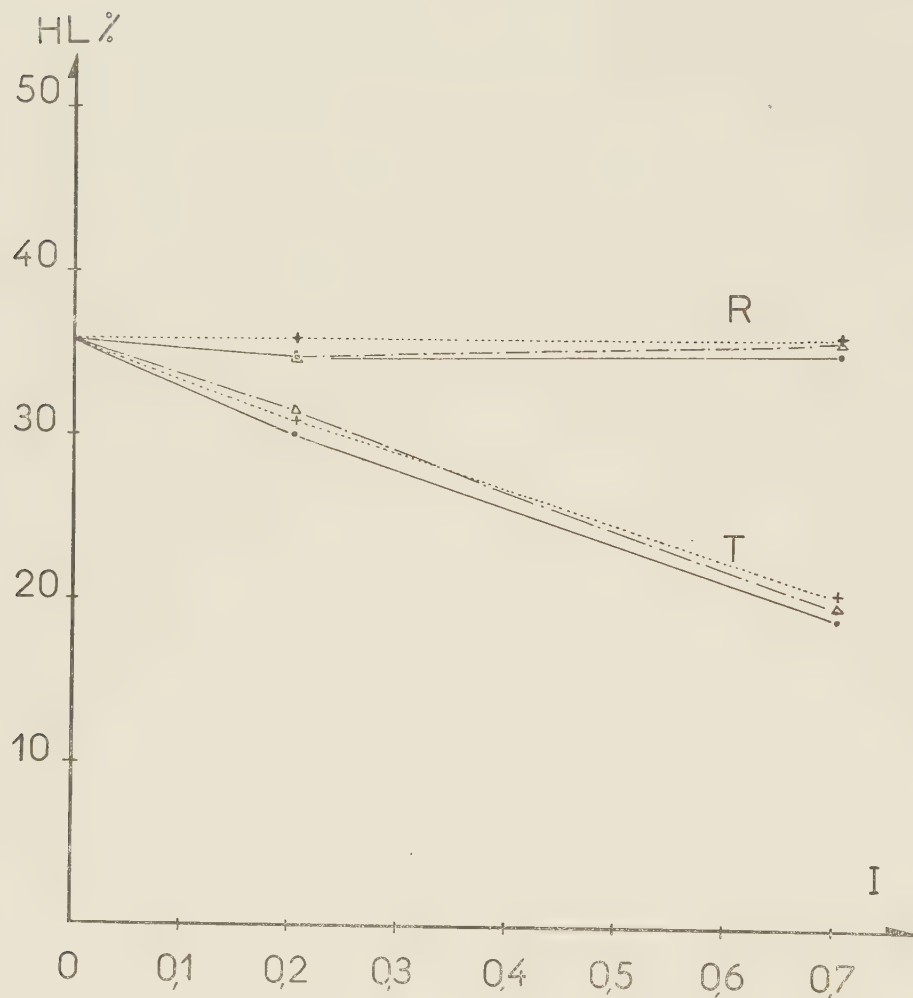


FIG. 6 - Pourcentage d'hémolyse obtenu en fonction de la quantité d'inhibiteur pour trois liquides allantoiniques, après (R) ou sans action (T) du periodate à 0,5 p. 100.

III - D I S C U S S I O N

L'inhibiteur de l'hémolyse d'une part et celui de l'hémagglutination d'autre part, se comportent tout à fait parallèlement dans les différentes épreuves, notamment vis-à-vis du chauffage, du periodate ou de la

neuraminidase du vibrion cholérique. Il est donc probable qu'ils ne constituent en réalité qu'une seule et même substance.

Des considérations embryologiques permettent de donner une explication à cette apparition soudaine de l'inhibiteur au douzième jour d'incubation. A ce moment, en effet, s'établit dans l'oeuf embryonné une communication entre l'amnios et les restes du blanc d'oeuf contenus dans le sac de l'albumen. L'entrée de l'albumen dans la cavité amniotique modifie profondément les caractéristiques du liquide de celle-ci, en particulier elle en ~~augmente~~ la teneur en protéines et la viscosité. Elle doit évidemment y introduire les mucopolysaccharides contenus dans l'albumen, notamment l'ovomucine, inhibiteur puissant de l'hémagglutination (Lanni (76)). Mais depuis le neuvième jour, l'embryon a commencé des mouvements de déglutition qui deviennent de plus en plus fréquents à mesure que s'avance son développement. Ainsi, l'embryon avale le liquide amniotique. La pénétration de l'albumen dans ce dernier entraîne donc secondairement une modification de la composition du liquide allantoïque où s'accumulent les produits de l'élimination rénale de l'embryon. En effet, on voit dès cet instant, le liquide allantoïque se charger en urates, tandis que le pH légèrement alcalin jusqu'alors, devient franchement acide. On conçoit aisément que du fait de l'élimination des déchets, le liquide allantoïque puisse se charger à son tour des inhibiteurs primitivement contenus dans l'albumen pour peu qu'ils ne soient pas métabolisés ou ne le soient que partiellement.

* *

*

Au point de vue pratique, le moment optimum pour l'inoculation des embryons par la voie allantoïque à l'aide de Myxovirus parainfluenzae I semble donc être le neuvième jour d'incubation. L'inoculation sera pratiquée avec une dilution assez faible (10^{-4}) et les liquides embryonnaires récoltés après une incubation supplémentaire de deux jours à la température de + 35°C.

CHAPITRE TROISIEME

TECHNIQUES DE PURIFICATION DES MYXOVIRUS ET METHODE D'EXTRACTION DE L'HEMAGGLUTININE

Pour pouvoir suivre avec certitude les caractères hémagglutinant, hémolytique et neuraminidasique au cours des traitements physiques ou chimiques et pour que les méthodes de titrage soient valables, il est nécessaire, dans un premier temps, d'éliminer les impuretés telles que les longues molécules mucoprotéiniques-isolées à partir des liquides allantoïques infectés ou non - pour lesquelles la constante de sédimentation est identique à celle des particules virales, d'après Buzzel et Hanig (77).

Bien que celles-ci se concentrent par sédimentation, après plusieurs jours à la température de + 4°C, ce procédé, préconisé par Reinhard et Mac Graw (78) ne suffit pas pour purifier le virus qui se trouve intimement mêlé aux filaments mucoprotéiniques et aux autres débris cellulaires non spécifiques. C'est pourquoi Veeraraghavan et Steevens (79, 80) traitent ce dépôt à l'aide d'une solution de chlorure de sodium à la concentration finale de 1,25 M, puis font passer la suspension obtenue sur une colonne de phosphate d'alumine comme Miller et Schlesinger (81) et Frommberger et Knight (82) l'avaient conseillé pour éviter la contamination des virus par les débris globulaires lors des techniques d'adsorption et élution sur hématies (Hirst, Rivers et Horsfall (83)).

L'élution est réalisée par le tampon phosphate 0,125 M à pH 5,0 dans le cas du virus A et par l'eau distillée dans le cas du virus B, mais Kudo (84,85), grâce à ce procédé appliqué à Myxovirus parainfluenzae I

remarque la diminution du pouvoir hémolytique après passage sur colonne de phosphate d'alumine. Smirnova et Levyant (86) utilisent l'adsorption sur Sephadex G-75 pour éviter cet inconvénient.

D'autres supports tels que l'Amberlite IRA-400 (Matheka et Armbruster (87)), la diéthylaminoéthylcellulose (Schmidt, Hartmann et Grossgebauer (88)), les systèmes de polymères aqueux à deux phases comme le dextran et la méthylcellulose ou le polyéthylène glycol (Philipson, Albertsson et Frick (89)), la Norit à la concentration de 10 % (Polley (90)), ont successivement été utilisés avec des fortunes diverses qui tiennent plus à la nature du virus qu'à celle du support.

Dans le cas particulier de Myxovirus parainfluenzae I, Nicoli, Bétail et Colobert (91) ont purifié ce virus à l'aide d'une méthode qui utilise l'affinité des Myxovirus sur les glycopeptides substrats de la neuraminidase après les avoir insolubilisés par copulation sur la cellulose. L'adsorption du virus à 0°C sur la cellulose à laquelle on a fixé par diazotation le mucopolysaccharide extrait de la glande sous-maxillaire de boeuf (MDBC), suivie d'une élution par élévation de la température à + 37°C peut être utilisée pour purifier le virus, le rendement étant de l'ordre de 70 p. 100 si le rapport entre la quantité de virus et la quantité de M D B C est convenablement choisi. Il est également possible de purifier le virus par adsorption sur diéthylaminoéthylcellulose, l'élution étant obtenue à l'aide d'une solution concentrée de chlorure de sodium. La combinaison de ces deux procédés utilisant dans le virus deux propriétés distinctes et indépendantes permet d'obtenir une purification extrêmement poussée avec un rendement final supérieur à 50 p. 100.

Si on se rapporte au pouvoir hémagglutinant pour déterminer la concentration et la purification de la suspension, ces procédés sont satisfaisants, mais avec des virus complexes tels que Myxovirus parainfluenzae I, l'élution par des solutions de chlorure de sodium à molarité élevée peut provoquer des modifications de structure qui se traduisent par des variations dans les pouvoirs hémolytique et neuraminidasique.

Au cours de la mise au point des méthodes de titrage du pouvoir enzymatique, nous avons préféré purifier Myxovirus parainfluenzae I par adsorption sur hématies de veau formolées, suivie d'élution par l'eau distillée, chaque étape étant contrôlée par spectrographie infrarouge, tandis que Myxovirus influenzae B (souche Lee) était purifié par chromatographie frontale sur phosphate de calcium. Dans les autres cas, nous nous sommes contentés d'une purification par centrifugation différentielle précédée ou non d'une précipitation par l'alcool méthylique redistillé. Enfin, nous décrirons dans ce chapitre, la technique d'extraction de l'hémagglutinine.

I - PURIFICATION DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I PAR ADSORPTION-ELUTION.-

Le liquide allantoïque infecté par la souche 52 du virus Sendai récolté suivant les conditions optimales que nous venons de définir, a été purifié par deux cycles d'adsorption-élution sur des hématies formolées, préparées suivant la méthode de Cox et Pirtle (92) afin d'éviter l'hémolyse due à ce virus.

Le traitement par le formol des récepteurs globulaires ne modifie ni leur propriété d'adsorption-élution, ni leur spécificité pour les virus suivant le gradient de récepteur, d'après Brand et Lippelt (93), mais ce phénomène ne serait pas général pour Buckland (94).

Cette méthode, que nous avons appliquée à des hématies de veau, consiste, après avoir défibriné le sang, à le diluer au demi avec une solution tamponnée*, puis à mélanger rapidement la suspension obtenue avec 40 % d'une solution de formol à 15 % **, avant de la porter au bain-marie à la température de + 37°C pendant 90 minutes, en agitant fréquemment. Après centrifugation et double lavage dans un volume de solution tamponnée

* Na Cl.....0,137 M
PO₄H Na₂.....0,01 M
PO₄H₂K.....0,003 M
H₂O.....q.s.p. 1000 ml

** formol Merck 30 %
solution tamponnée pH 7,2 } ââ

correspondant à 50 fois le volume initial d'hématies, suivi d'une seconde formolisation du culot recueilli sur centrifugeuse Sharples, on effectue six lavages successifs selon Ingraham (95) avant la mise en suspension finale dans un volume de tampon contenant 0,3 % de formol.

Chaque fraction de 100 ml de liquide allantoïque a été mise en contact, sous agitation, pendant vingt minutes à la température de + 4°C, avec 4,5 ml de culot d'hématies formolées, conservées lyophilisées selon Gold, Lockyer et Tovey (96), et rehydratées avant l'emploi. Après une centrifugation à 5000 g pendant dix minutes, le surnageant est titré du point de vue hémagglutinant et hémolytique. Aussi longtemps que ce titrage est positif, on continue les adsorptions sur le culot d'hématies. Lorsque le surnageant est négatif, on réunit les culots et on élue le virus par de l'eau bidistillée stérile. En effet, pour Barua (97), l'élution par l'eau distillée doit être préférée à celle qui utilise un soluté isotonique de chlorure de sodium car, dans le premier cas, il se produit une élution mécanique par rupture des faibles liaisons et libération spontanée des chaînes polysaccharidiques des récepteurs même à la température de + 4°C, tandis que l'élution en présence d'ions, qui nécessite une température plus élevée représentant l'énergie suffisante pour que le phénomène puisse se produire, peut provoquer une dénaturation.

Plusieurs éluations successives (E_1 , E_2) ont été effectuées jusqu'à épuisement des culots. On rassemble les différents éluats dont le titre hémagglutinant est suffisant et on termine la purification par un deuxième cycle similaire après avoir tamponné l'éluat total (tableau XI).

II - LA SPECTROGRAPHIE INFRAROUGE APPLIQUEE AU CONTROLE DE LA PURIFICATION DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I PAR ADSORPTION-ELUTION. - La spectrographie infrarouge peut servir de moyen de contrôle ou d'identification des produits isolés après désintégration des particules virales. Ainsi Frommhagen, Knight et Freeman (98) après fractionnement des lipides des types A (souche PR 8), B (souche Lee) de Myxovirus sur colonne d'acide silicique-célite (2 : 1) montrèrent la présence,

	Volume (ml)	titre HA	% HL	pH	total U HA
liquide allantoïque brut	1230	320	89	7,7	384 000
liquide all. centrifugé à 5000 g	1200	160	45	7,7	192 000
1er cycle d'adsorption					
S _I	1200	8	32	7,2	9 600
S ₂	1200	4	3	7,2	4 800
S ₃	1200	0	0	7,2	0
1er cycle d'élution					
E _I	600	2	7	7	1 200
E ₂	400	40	56	6,7	16 000
E ₃	400	160	88	6,7	64 000
E ₄	400	320	88	6,5	128 000
E total	1200	160	88	6,7	192 000
2ème cycle d'adsorption					
S' _I	1320	16	22	7,2	21 120
S' ₂	1320	0	3	7,2	0
2ème cycle d'élution					
E' _I	500	8	16	7,2	4000
E' ₂	300	40	29	7,2	12 000
E' ₃	300	40	56	6,7	12 000
E' ₄	300	160	88	6,5	18 000
E' total	900	80	80	6,5	72 000

Tableau XI - Purification de Myxovirus parainfluenzae I par
2 cycles d'adsorption sur hématies de veau formolées,
S, S' , surnageants après le 1er et le 2ème cycle d'ad-
sorption,

- du cholestérol, grâce à l'existence d'une bande de vibration caractéristique à 1053 cm^{-1} ($9,5 \mu$),
- de groupements esters phosphoriques entre 1235 cm^{-1} ($8,1 \mu$) et 1064 cm^{-1} ($9,4 \mu$),
- de groupements esters carboxyliques entre 1739 cm^{-1} ($5,75 \mu$) et 1724 cm^{-1} ($5,80 \mu$).

Mais de même que la spectrographie infrarouge a été utilisée avec des bactéries complètes (Fontanges (99)), les spectres des particules entières de différentes souches virales ont été étudiés par Pollard et Engley (100) pour différencier les virus de la méningopneumonie, de l'ornithose, des oreillons et de la maladie de Newcastle. Devant ce procédé nouveau qui paraissait prometteur, Benedict (101) après une étude sur l'influence du milieu, de l'âge de la culture, de la température d'incubation, groupa les virus étudiés en quatre catégories d'après leur spectre infrarouge :

- Virus de la maladie de Newcastle,
- Virus de la psittacose, de la méningopneumonie, de la lympho-granulomatose vénérienne,
- Virus de la vaccine,
- Virus de la grippe, des oreillons et constituants normaux de l'hôte.

Siegel, Freeman et Bostick (102) en revanche, ne trouvèrent aucune différence spectrale entre les tissus infectés par un granulome de Hodgkin sur souris albinos et la préparation témoin de tissu normal.

Nous avons voulu suivre l'évolution du spectre infrarouge d'un liquide allantoïque infecté au cours de deux cycles d'adsorption-élution sur hématies formolées, pour rechercher si cette méthode physique pouvait servir de critère dans l'appréciation du degré de purification de Myxovirus parainfluenzae I.

L'appareil employé est un spectrographe infrarouge à double faisceau de marque Leitz (n° I50), à prisme Na Cl. Nous avons utilisé la technique des pastilles au bromure de potassium *. A 1 g de ce produit préalablement desséché au four à vide à + 180°C pendant quatre heures, on ajoute 2 mg de substance à analyser, lyophilisée** dans des conditions strictes de température contrôlée par enregistrement de la résistivité, pour éviter toute dénaturation pendant la phase primaire de dessiccation.

A - LIQUIDE ALLANTOÏQUE NON CENTRIFUGE. - Si l'on compare les spectres des liquides allantoïques infectés ou non par Myxovirus parainfluenzae I et récoltés au IIème jour d'incubation, on observe une superposition absolue des deux enregistrements constitués principalement par trois massifs mal résolus vers 1613 cm^{-1} ($6,20\mu$), 1399 cm^{-1} ($7,15\mu$) et 1053 cm^{-1} ($9,5\mu$) (fig. 7, V et T).

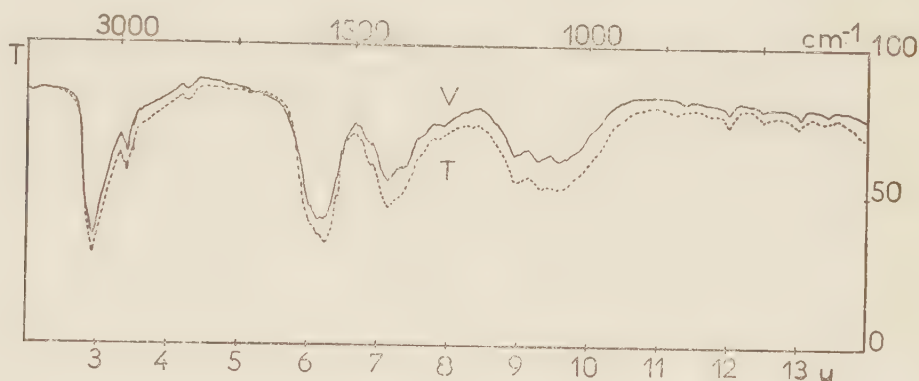


FIG. 7 - Spectre infrarouge du liquide allantoïque non centrifugé, lyophilisé.

V, liquide infecté

T, liquide non infecté.

(2 mg de produit pour 1 g de bromure de potassium).

* Bromure de potassium pour spectrographie, Merck.

** Appareil à lyophiliser " Usifroid" (procédé Rieutord) - 9, rue Moreau-Vauthier - Boulogne (Seine).

B - LIQUIDE ALLANTOÏQUE CENTRIFUGE. - La centrifugation de ces liquides allantoïques infectés ou non est effectuée à 5000 g pendant dix minutes, pour éliminer les précipités de phosphates et d'urates. La comparaison des spectres de ces deux surnageants montre à nouveau une superposition des tracés (fig. 8, V et T). On remarque cependant, pour des quantités identiques, une meilleure résolution vers 1613 cm^{-1} ($6,20\text{ }\mu$) et entre 1111 cm^{-1} et 1000 cm^{-1} ($9\text{ et }10\text{ }\mu$) si on compare ces spectres à ceux qui ont été enregistrés avec des liquides allantoïques non centrifugés.

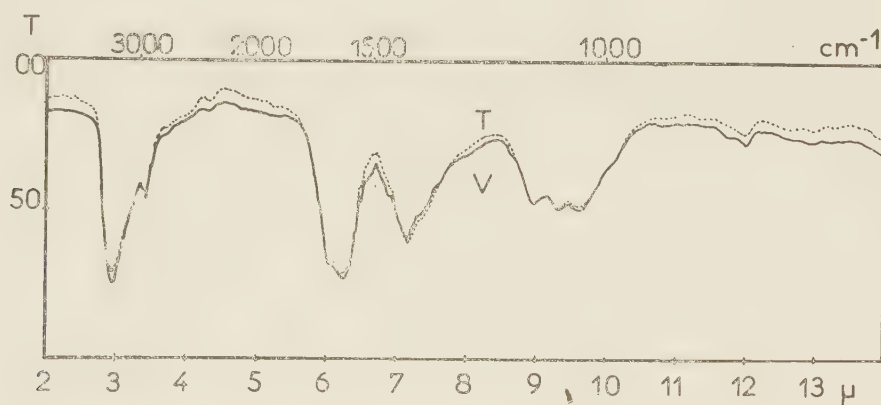


FIG. 8 - Spectre infrarouge du liquide allantoïque centrifugé à 5000 g pendant 10 minutes,
V, liquide infecté,
T, liquide non infecté.

L'ultracentrifugation à 105 000 g pendant 2 h. sépare le culot - constitué par les particules virales dont le titre hémagglutinant est dans le rapport de concentration- du surnageant pour lequel une seconde, puis une troisième ultracentrifugation sont nécessaires pour éliminer totalement les particules hémagglutinantes.

On constate à nouveau l'étroite similitude entre les spectres infrarouge de ces préparations constituées par le culot (fig. 9 C) et par le surnageant (fig. 9 S).

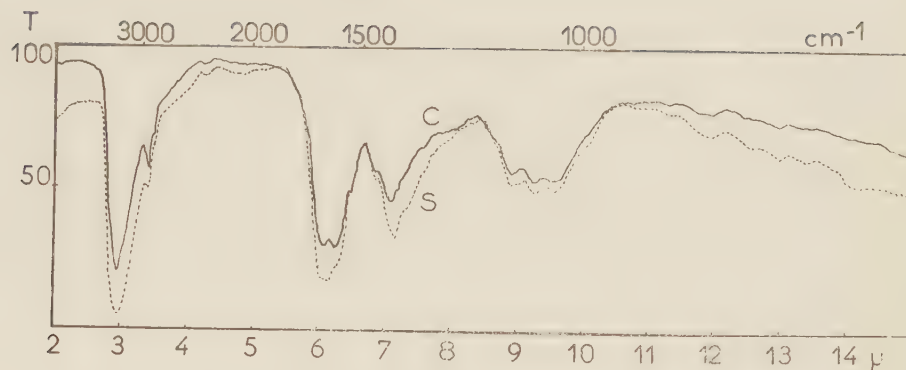


FIG. 9 - Spectre infrarouge du liquide allantoinique ultracentrifugé à 105 000 g pendant 2 h.,
C, culot de sédimentation,
S, surnageant de centrifugation.
(2 mg de produit lyophilisé pour 1 g de bromure de potassium).

Ces spectres sont formés des vibrations suivantes :

- une bande d'absorption à 3390 cm^{-1} ($2,95\text{ }\mu$) qui correspond à la vibration de valence des OH liés.
- le doublet des vibrations de valence des CH antisymétriques à 2924 cm^{-1} ($3,42\text{ }\mu$) et des CH symétriques à 2849 cm^{-1} ($3,51\text{ }\mu$).
- un massif qui présente deux maximums d'absorption à 1653 cm^{-1} ($6,05\text{ }\mu$) et à 1600 cm^{-1} ($6,25\text{ }\mu$), et une bande de faible intensité à 1538 cm^{-1} ($6,50\text{ }\mu$). Ces bandes correspondent vraisemblablement aux vibrations de valence Amide I (1653 cm^{-1}) et Amide II (1538 cm^{-1}) de la liaison CO-NH.
- un pic à 1408 cm^{-1} ($7,10\text{ }\mu$) qui pourrait être dû, ainsi que certaines bandes du massif suivant vers 1117 cm^{-1} ($8,95\text{ }\mu$), à des polysaccharides, puisqu'ils disparaissent ou sont atténués par l'acide trichloracétique à 10 %, à froid. Cependant, le même phénomène étant observé à l'aide de l'acide trichloracétique à 5 % à chaud (Benedict (103)), on peut penser que ce massif représente à la fois les vibrations des polysaccharides et celles des acides nucléiques.

C - LIQUIDE ALLANTOIQUE INFECTE ,PURIFIE PAR DOUBLE ADSORPTION-ELUTION SUR HEMATIES DE VEAU FORMOLEES.- Lorsqu'on purifie Myxovirus parainfluenzae I à l'aide d'un premier cycle d'adsorption-élution sur hématies de veau formolées,les surnageants d'adsorption,après centrifugation à 5000 g pendant dix minutes,présentent des spectres infrarouges identiques,quel que soit le titre hémagglutinant ou hémolytique restant.Ces spectres sont strictement superposables à ceux qui sont obtenus avec le culot provenant de l'ultracentrifugation.

De même,si les titres hémagglutinant et hémolytique s'élèvent au cours des éluations successives en eau distillée à partir des hématies formolées, en revanche,les spectres infrarouges de ces éluats ne présentent aucune différence entre eux.

Le deuxième cycle d'adsorption-élution,après avoir repris l'éluat total par une solution tamponnée de Cox (92),conduit au même résultat,c'est à dire que les spectres des surnageants et des éluats sont identiques entre eux,mais sont différents de ceux obtenus après le premier cycle,par suite de la présence des massifs de vibrations des ions phosphate vers 1163 cm^{-1} ($8,6\mu$) et 1075 cm^{-1} ($9,30\mu$) (fig. IO V).

On remarque la diminution de la bande à 1600 cm^{-1} ($6,25\mu$),diminution d'autant plus prononcée que le cycle est plus long.

Ainsi,au fur et à mesure des opérations d'ultracentrifugation différentielle ou d'adsorption-élution sur hématies de veau formolées,les massifs de vibrations sont mieux résolus,des pics apparaissent,ce qui témoigne d'un certain degré de purification. Cependant,pour éviter les causes d'erreur dues notamment aux sels qui peuvent rester adsorbés à des stromas d'hématies centrifugés puis lyophilisés,il était nécessaire d'effectuer un contrôle avec du liquide allantoïque non infecté qui suivait le même processus d'adsorption-élution (fig.IO T).

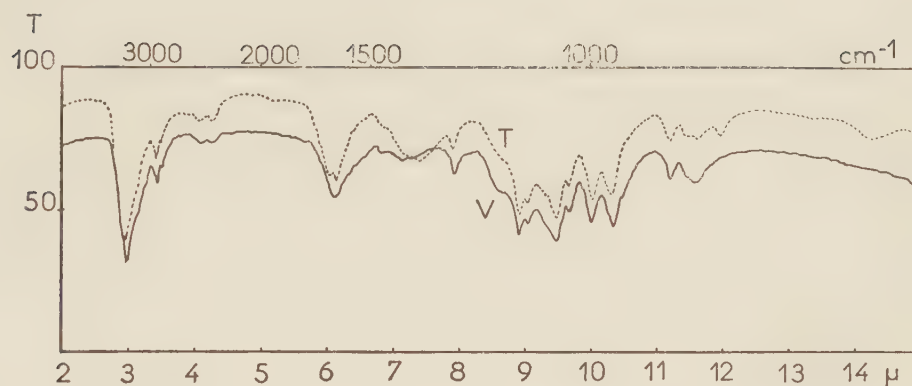


FIG. 10 - Spectre infrarouge du liquide allantoïque purifié par double adsorption-élution sur hématies formolées, V, liquide allantoïque infecté, T, liquide allantoïque non infecté.

L'étude comparative des spectres de la fig.10 montre une très grande similitude ,ce qui tendrait à prouver d'une part que la quantité d'acide nucléique viral étant très faible (de l'ordre de 1%),il est impossible de différencier la particule virale du liquide hôte à l'aide de cette méthode et d'autre part,qu'il se produit une adsorption-élution mécanique non spécifique du phénomène viral,c'est-à-dire non enzymatique.

III - PURIFICATION DE MYXOVIRUS INFLUENZAE B PAR CHROMATOGRAPHIE FRONTALE.-

On part de liquides allantoïques provenant d'oeufs embryonnés,infectés au dixième jour d'incubation par l'injection dans la cavité allantoïque,de 0,2 ml d'une dilution à 10^{-4} d'une suspension virale titrant entre 320 et 640 unités hémagglutinantes Hirst.On procède à la récolte,après deux jours d'incubation à la température de + 35° C et à 80 % d'humidité relative.

Les virions sont alors purifiés par chromatographie frontale sur

phosphate de calcium selon une adaptation de la méthode de Taverne ,Marshall et Fulton (104). On fait passer 150 ml à 200 ml de liquide allantoïque à travers une colonne de brushite de 40 mm de diamètre et de 200 mm de hauteur ,le volume de l'eau retenue étant de l'ordre de 200 ml. On lave la colonne avec 500 ml d'eau distillée puis avec 500 ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7.

La suspension virale est ensuite dialysée contre de l'eau distillée à la température de + 4°C jusqu'à élimination des phosphates, puis rechromatographiée dans les mêmes conditions que précédemment sur une petite colonne de brushite de 10 mm de diamètre, le volume de l'eau étant de 10 ml. On utilise pour le lavage 50 ml d'eau distillée puis 50 ml de tampon 0,06 M. Cette seconde chromatographie permet de concentrer le virus qui atteint, dans une ou deux fractions, un titre supérieur à 10 000 unités hémagglutinantes Hirst.

IV - TECHNIQUE D'EXTRACTION DE L'HEMAGGLUTININE.- Dans un premier temps, les virions contenus dans un volume V de liquide allantoïque infecté par Myxovirus influenzae B sont précipités par le méthanol redistillé à 31 % du volume final, à la température de la glace fondante pendant trois heures d'après la technique de Cox, Van der Scheer, Aiston et Bohnel (105). Après une ultracentrifugation à froid (100 000 g pendant deux heures), le culot est repris par un volume $\frac{V}{5}$ de solution tampon phosphate 0,02 M de pH 6,24 *. On centrifuge à nouveau dans les mêmes conditions et le culot est remis en suspension dans un volume $\frac{V}{10}$ de solution tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4** ,en homogénéisant soigneusement le mélange à la seringue.

* tampon phosphate 0,02 M,pH 6,24 : à 80 ml de solution de phosphate monopotassique 0,02 M on ajoute 20 ml de solution de phosphate disodique 0,02 M.

* * tampon phosphate 0,1 M,pH 7,4 : à 20 ml de solution de phosphate monopotassique M,on ajoute 30 ml de solution de phosphate dipotassique M et 450 ml d'eau bidistillée.

Dans un second temps, la désintégration des particules virales est obtenue par l'éther selon la technique de Hoyle (106), Frisch - Niggemeyer (107), de préférence à celle qui utilise les ultrasons, lesquels, d'après Lief et Henlé (108) ne permettent pas suffisamment de réaliser la rupture de la particule, puisqu'un traitement ultérieur par l'éther produit encore une libération d'antigène soluble (Ag S). Les conditions optimales de température, de temps d'exposition ont été définies par Lief et Henlé (108).

On introduit dans un appareil de Soxhlet, ce volume $\frac{V}{10}$ de virus préalablement concentré par précipitation à l'aide du méthanol. L'extraction continue des lipides, provenant de la désintégration des virions, est pratiquée pendant deux heures par l'oxyde d'éthyle déperoxydé bouillant*. Après repos suivi de centrifugation, on décante la phase aqueuse qui contient l'hémagglutinine et l'antigène soluble, tandis que la phase étherée qui est constituée par les lipides, est évaporée sous vide jusqu'à dessiccation complète, en vue de travaux ultérieurs. Enfin, il est fréquent de noter la présence d'une troisième phase solide, à l'interface des précédentes, qui est recueillie pour une analyse chimique et spectrographique.

La phase aqueuse est ensuite traitée par la technique de Lief et Henlé (108) qui sépare l'hémagglutinine de l'antigène soluble. On met en contact cette phase aqueuse de volume v et de titre hémagglutinant t (dé-

* Préparation de l'oxyde d'éthyle déperoxydé : A 1 litre d'éther, on ajoute dans une ampoule à décantation, 100 ml d'une solution de bisulfite de soude à 10 %. On agite jusqu'à ce que le test à l'iodure soit de faible intensité. On soutire la phase aqueuse. On lave avec un mélange constitué par 100 ml de solution saturée de chlorure de sodium et 0,5 g de soude en pastille. Après agitation, on soutire la phase aqueuse, puis on lave de nouveau avec un mélange de 100 ml de solution saturée de chlorure de sodium et 1 ml d'acide sulfurique concentré. On agite et on soutire la phase aqueuse. On ajoute un volume égal de solution saturée de chlorure de sodium ; on récupère la phase aqueuse, puis on distille à la température de 34,5°C.

terminé par la méthode des dilutions successives en tubes, avec lecture directe) avec une suspension d'hématies humaines O Rh.+, à la concentration de 1,5 % dans un soluté isotonique de chlorure de sodium. Le volume V_{GR} de cette suspension est donné par la formule :

$$V_{GR} = \frac{v \times t}{320}$$

Après une adsorption à la température de la glace fondante, pendant une heure, on centrifuge à 5000 g pendant dix minutes, à cette même température. Le surnageant, qui contient l'antigène soluble est conservé pour des études complémentaires, tandis que le culot d'hématies est repris par un volume v de soluté isotonique de chlorure de sodium. Après remise en suspension et élution pendant 6 heures à la température de 37°C, on centrifuge à 5000 g pendant dix minutes. Le surnageant constitue l'hémagglutinine. La préparation, contrôlée au microscope électronique * met en évidence la présence de petites particules de 30 m μ de diamètre et souligne l'absence de virions comme l'avaient montré Blaskovic (I09) puis Hoyle, Horne et Waterson (II0, III) sur d'autres Myxovirus.

Dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, on utilise la même technique, mais en substituant des hématies formolées aux hématies fraîches pour éviter le phénomène de l'hémolyse.

- SPECTRE INFRAROUGE DE L'HEMAGGLUTININE. - Pour éviter l'interférence des vibrations dues aux ions phosphate, on élue l'hémagglutinine dans une seconde préparation à l'aide d'eau distillée stérile au lieu d'employer un soluté isotonique de chlorure de sodium. On obtient grâce à cette technique, un liquide très clair, débarrassé de toute hématie, sans trace d'hémoglobine et qui titre 30 000 Unités Hirst.

* Microscope électronique EM I00 Philips.

Le spectre infrarouge de cette substance (fig. II), lyophilisée et préparée selon la méthode au bromure de potassium, est caractérisée par un volumineux massif dans la région de 1111 cm^{-1} ($9\text{ }\mu$) suivi d'une bande à 985 cm^{-1} ($10,15\text{ }\mu$) et d'un pic à 1653 cm^{-1} ($6,05\text{ }\mu$) accompagné d'un épaulement à 1538 cm^{-1} ($6,50\text{ }\mu$).

Cet ensemble de vibrations est celui d'un complexe polysaccharidique et protéinique.

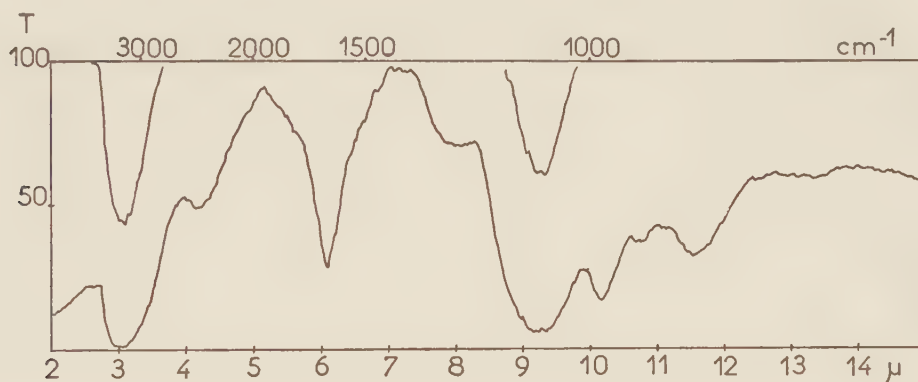


FIG. II - Spectre infrarouge de l'hémagglutinine de Myxovirus influenzae B.

* *

*

Les méthodes de purification de Myxovirus parainfluenzae I par adsorption-élution sur hématies de veau formolées, et de Myxovirus influenzae B à l'aide d'une chromatographie frontale sur phosphate de calcium, nous ont permis d'obtenir des préparations virales concentrées et débarrassées de leurs impuretés, tandis que la désintégration par l'éther conduisait à l'extraction d'une part de l'hémagglutinine au spectre infrarouge caractéristique et d'autre part de l'antigène soluble.

Si l'étude des spectres infrarouges nous a montré l'évolution de la purification par l'apparition des bandes fines de vibration, en revanche, cette méthode ne nous a pas permis de caractériser la particule virale puisque son spectre était identique à celui du matériel hôte non infecté ce qui peut s'expliquer par la présence, contrôlée au microscope électronique, de particules cytoplasmiques détachées des cellules ectodermiques de la membrane chorio-allantoïque et formées d'un matériel granuleux amorphe. Comme l'avait déjà montré Hoyle (II2) en 1962, ces particules, distinctes de Myxovirus par l'absence d'une couche superficielle et de composants hélicoïdaux internes, se retrouvent avec eux au cours de la centrifugation différentielle.

CHAPITRE QUATRIEME

ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU VIRUS GRIPPAL PAR LA TECHNIQUE DE VISCOSIMETRIE.

La découverte de l'activité enzymatique de Myxovirus influenzae remonte à l'observation de Hirst et Pickels (II3, II4) en 1942, par laquelle l'adsorption à + 4°C du virus grippal sur les hématies était suivie d'une élution de la particule virale lorsque cette température était portée à + 37°C. Les particules virales sont ensuite capables de s'adsorber à nouveau sur des hématies fraîches mais non plus sur les hématies qui les ont préalablement adsorbées. Pour ces auteurs, le virus possédait une substance capable de le détacher d'un récepteur de l'hématie (Hirst (II5)) en l'altérant définitivement.

En 1951, Burnet (II6) montra que l'enzyme, contenu dans le filtrat du vibron cholérique produisait le même phénomène vis-à-vis des substances réceptrices des hématies. Cet enzyme responsable fut appelé le "Receptor Destroying Enzyme" (R.D.E.).

La nature du phénomène se précisa lorsque Gottschalk (II7), puis Gottschalk et Lind (II8) en 1949, mettant de l'ovomucine en présence du virus de la grippe, recueillirent par simple dialyse, une substance de faible poids moléculaire, substance non retrouvée lorsque le liquide allantoïque infecté était remplacé par du liquide allantoïque normal.

Les travaux se multiplièrent alors pour identifier le produit libéré et rechercher des substrats nouveaux. L'ovomucine fut encore utilisée par Gottschalk et Perry (II9), mais il fallut attendre les travaux de

Curtain et Pye (I20) sur les mucopolysaccharides des glandes sous-maxillaires de boeuf, (ce qui eût pour effet de sortir de l'ombre les travaux de Blix (I2I) effectués vingt ans plus tôt), puis les études de Gottschalk (I22, I23, I24, I25) et de Gottschalk et Graham (I26) sur la structure de ce mucopolysaccharide, enfin ceux de Tsuiki, Hashimoto et Pigman (I27), de Pigman et Hashimoto (I28) qui améliorèrent les méthodes d'extraction et ceux de Heimer et Meyer (I29) qui firent progresser les techniques de purification, pour comprendre le mode et le lieu d'action de l'enzyme viral (fig. I2).

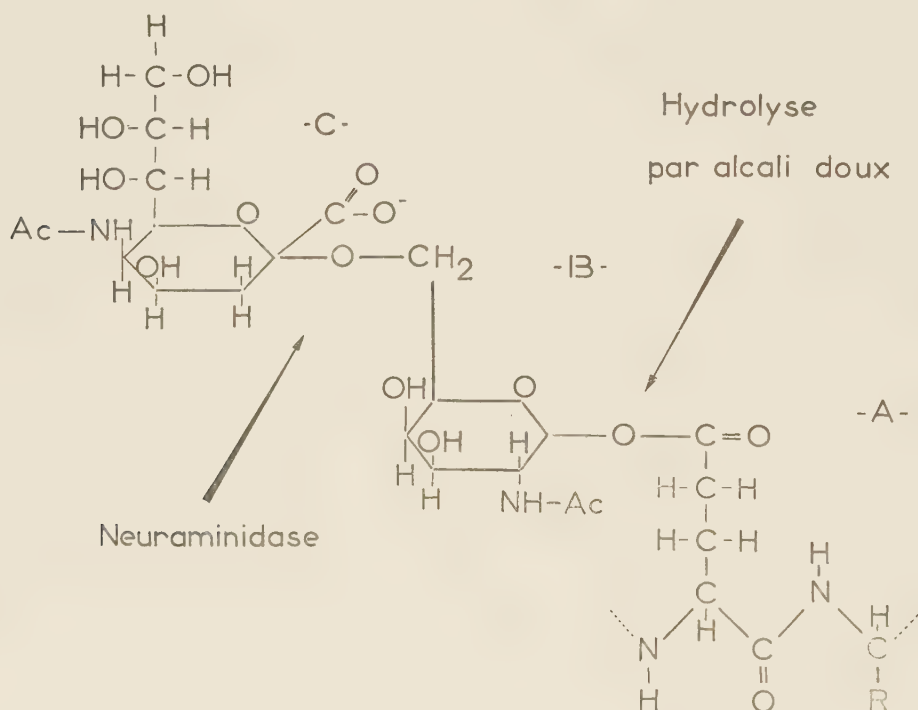


FIG. I2 - Lieu d'action de l'enzyme neuraminidasique sur la molécule de mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf

- A, polypeptide,
- B, N-acétylgalactosamine,
- C, Acide N-acétyl-neuraminique,
- B + C, 6 α - D - sialyl-N-acétylgalactosamine = groupement prosthétique de la mucoprotéine.

Le mucus bronchique, étudié par White, Elmes et Whitley (I30), le mucopolysaccharide urinaire isolé par Ada et Gottschalk (I31) puis par Gottschalk (I32, I33), Klenk, Faillard et Lempfrid (I34), Tamm et Horsfall (I35), le mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de mouton, extrait par Svennerholm (I36) et dont la structure du groupement prosthétique a été établie par Graham et Gottschalk (I37) et par Gottschalk (I38), ont fourni d'autres substrats pour l'étude de l'action enzymatique du virus grippal, de même que les mucopolysaccharides isolés du méconium humain par Zilliken, Werner, Silver et György (I39) ou du blanc d'oeuf par Lanni (76).

L'identification par Kuhn et Brossmer (I40, I41, I42) dans le colostrum de vache, d'une substance de faible poids moléculaire, dont la structure a été établie par ces auteurs (I43, I44, I45) comme étant l'acide 3' lactose-lactaminique, travaux confirmés et précisés par ceux parallèles de Zilliken, Braun et György (I46, I47), Heimer et Meyer (I48), Clark, Jackson et Pallausch (I49) Schmidt (I50), permet d'utiliser un substrat simple pour l'étude du pouvoir enzymatique du virus grippal (fig. I3).

D'autres substrats mucoprotéiniques ont encore été découverts, dans le sérum par Martensson, Raal et Svennerholm (I51), dans les tissus par Weiss (I52), dans différents organes de mammifères par Carubelli, Trucco et Caputto (I53) dans les membranes chorio-allantoïques par Laucikova (I54) et par Tess et Kempf (I55), chez les bactéries par Barry, Tsai et Chen (I56) et par Dewitt et Rowe (I57).

La structure du produit libéré par cette action enzymatique a suscité de nombreuses recherches, notamment celles de Klenk et Lauenstein (I58) qui portent sur le substrat de la glande sous-maxillaire, celles de Klenk et Faillard (I59) qui partent de la fétuine, celles de Gottschalk (I60 à I66), Brug et Paerels (I67), Svennerholm (I68, I69, I70) qui l'isolent par chromatographie, celles de Comb et Roseman (I71) puis de Cornforth et Gottschalk (I72, I73) qui en font la synthèse, celles de Dumas et Alais (I74) qui l'obtiennent cristallisé à partir de la caséine de vache.

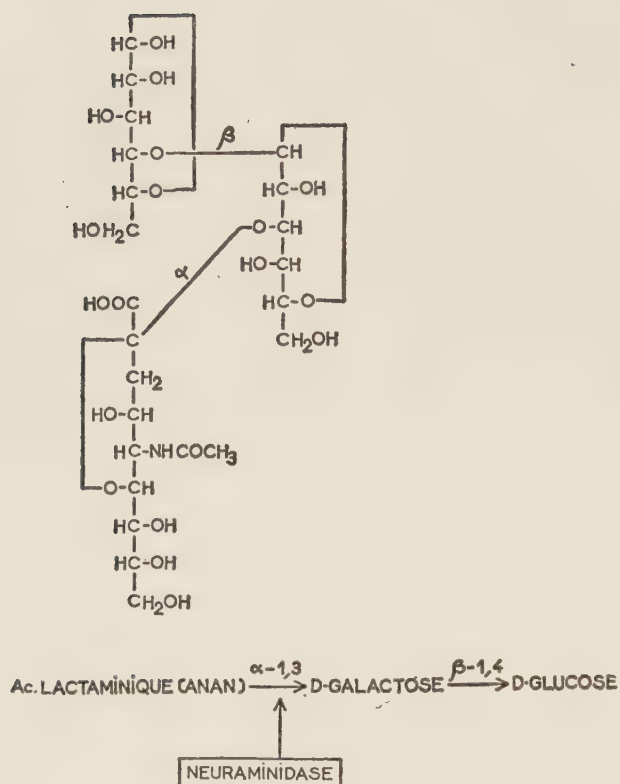


FIG. 13 - Lieu d'action de l'enzyme neuraminidasique sur la molécule d'acide 3' lactose-lactaminique.

Ce produit de clivage du substrat par l'enzyme fut nommé acide neuraminique * par Blix, Gottschalk et Klenk (175) en 1957, et le nom de neuraminidase fut donné par Gottschalk (176) en 1958, à l'enzyme qui détache cet acide ou ses dérivés, les acides sialiques étudiés par Warner et Blix (177) (tableau XII), de l'extrémité non réductrice de disaccharides, oligo-saccharides et polysaccharides divers.

* On désigne sous le nom d'acide neuraminique, le composé de base non substitué, non trouvé à l'état naturel et sous celui d'acide sialique, le nom de groupe de tous les acides neuraminiques substitués tels que N-acétylneuraminique, N-glycoylneuraminique, O-N-diacétylneuraminique.

Suivant Stacey (178), les acides sialiques ou neuraminiques peuvent être classés sous la dénomination plus récente d'acide nonulosaminiques, complexes de sucres et d'acides aminés.

	Formule	Synonymes
Acide neuraminique	$C_9H_{17}O_8N$	Acide préhémataminique
Acide méthyl-neuraminidosique	$C_{10}H_{19}O_8N$	Acide méthoxyneuraminique Acide hémataminique
Acide N-acétyl-S-neuraminique	$C_{11}H_{19}O_9N$	Acide O-sialique (mouton) Acide gynaminique Acide lactaminique Acide sérolactaminique
Acide N-acétyl-5-O-acétylneuraminique	$C_{13}H_{21}O_{10}N$	Acide B-sialique (bovidés)
Acide N-acétyl-5-O-acétyl-?-neuraminique	$C_{13}H_{21}O_{10}N$	Acide E-sialique (cheval)
Acide N-glycolyl-5-neuraminique	$C_{11}H_{19}O_{10}N$	Acide P-sialique (porc)

Tableau XII - Synonymes et formules de l'acide neuraminique et de ses dérivés.

L'acide neuraminique est lié à la N-acétyl-galactosamine du copule mucoprotéinique par une liaison α -cétone, Gottschalk (I26 - I38), Blix (I75 , I79), Kuhn (I44), Popenoe (I80).

Klenk et Stoffel (I81), Howe, Rose et Sheider (I82), Klenk et Uhlenbruck (I83), Kathan, Winzler et Johns~~on~~ (I84), Kathan et Winzler (I85) retrouvèrent et isolèrent l'inhibiteur de l'hémagglutination présent à la surface de l'hématie, et confirmèrent l'existence sur celui-ci de l'acide sialique en position terminale, tout en montrant la présence d'au moins seize résidus d'acides aminés dans le substrat total. Tischer (I86) admet que le contenu en acides neuraminiques ou sialiques des récepteurs des hématies conditionne sur ces derniers, l'action du virus grippal.

Tous ces travaux s'orientèrent bientôt sur la dernière phase du problème, c'est à dire la purification de la neuraminidase.

Cette purification de l'enzyme neuraminidasique fut entreprise sur le filtrat de culture du vibron cholérique (souche 4Z) par Kawamura (I87) puis par Ada et French (I88) qui utilisèrent des colonnes d'hydroxylapatite. Schramm et Mohr (I89) le purifièrent par précipitation à l'aide du sulfate d'ammonium à 1/2 saturation. L'influence des cations, l'inhibition par l'EDTA* au cours de la réaction enzyme-substrat furent mis en évidence par French et Ada (I90), et Ada, French et Lind (I91).

Enfin, Pye et Curtain (I92), Laver, Pye et Ada (I93) ont obtenu l'enzyme à l'état cristallisé, indiquant qu'il s'agissait vraisemblablement d'une protéine.

Pour tenter d'extraire cet enzyme des Myxovirus, Noll, Aoyagi et Orlando (I94, I95) dissocièrent la particule virale à l'aide de la trypsine

* Ethylène Diamine Tétracétique Acide

tandis que Laver utilisa le dodécylsulfate de soude ou le désoxycholate de soude.

Les enzymes viraux furent isolés à l'état cristallisé pour la première fois par Rafelson, Schneir et Wilson (I96), Wilson et Rafelson (I97), à partir des souches PR 8 et Asia, et leur différenciation entre eux fut obtenue par les caractères de leur cinétique lors de l'hydrolyse de l'acide 3' lactose-lactaminique. Rafelson a pu encore distinguer trois isomères dans cette substance, dont l'affinité pour la neuraminidase diffère.

D'après Gottschalk (I26), la constitution du mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf est formée d'une protéine centrale, portant à la périphérie de nombreux groupements prosthétiques liés à l'acide sialique terminal par une liaison α -glycosidique, ce qui a été confirmé depuis par Tsuiki, Hashimoto et Pigman (I27); l'action enzymatique du virus grippal pouvant ainsi être considérée comme un dépouillement progressif de la molécule, on peut se demander si l'activité neuraminidasique ne se traduirait pas par une variation de la viscosité du système et ne permettrait pas ainsi de titrer l'enzyme viral.

De fait, si Briody et Hanig (I98) en I949 ont échoué dans leur tentative de mettre en évidence l'action neuraminidasique du virus grippal par les techniques viscosimétriques et turbidimétriques, Wooley (I99), utilisant Myxovirus influenzae de type A et un mucopolysaccharide extrait des hématies humaines, Eckert, Lanni et Beart (200) utilisant le virus de la grippe du porc et une mucoprotéine isolée du blanc d'oeuf, ont observé une diminution de la viscosité des substrats par l'action des préparations virales purifiées.

Cependant, quelques années plus tard, Tamm, Bugher et Horsfall (20I) ont montré que la solution de mucoprotéine ne subit aucune variation de viscosité, malgré des expériences répétées, lorsque le substrat est le

mucopolysaccharide de l'urine humaine et l'enzyme, celui d'un Myxovirus. Ces résultats sont en accord avec ceux des études d'ultracentrifugation qui n'ont permis de déceler aucune variation dans la constante de sédimentation.

Cependant, Curtain (202, 203) en 1953, tout en établissant l'influence de la force ionique, du pH, des ions divalents, notamment du calcium dont on connaît le rôle dans la liaison virus-substrat (Burnet et Edney (204), conclut à une élévation de la viscosité en fonction du temps lorsqu'on met en présence le virus grippal de type B souche Lee et le mucopolysaccharide urinaire dans un viscosimètre capillaire. Pour cet auteur, cette augmentation de la viscosité est un effet purement électrostatique conformément aux travaux de Perlmann, Tamm et Horsfall (205), sur l'élévation du point isoélectrique dans des conditions similaires d'expérience.

Nous avons repris ce problème à l'aide d'un microviscosimètre très sensible et en utilisant comme substrat le mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf (Colobert et Fontanges (206)).

I - MATERIEL ET TECHNIQUES.

A - LE VISCOSIMETRE.- L'appareil employé (fig. I4) est un viscosimètre à cylindres coaxiaux, type Couette, modifié par Lecomte du Nouy (207) fabriqué selon un schéma nouveau par Electrona* . Cet appareil est un prototype qui a l'avantage sur les appareils de même type, de donner la valeur absolue des viscosités des liquides étudiés, directement sur un cadran.

Le principe est le suivant. Une cuve C, d'une contenance de 5 ml, est animée autour de son grand axe d'un mouvement circulaire uniforme, par l'intermédiaire de son logement B qui baigne dans un bain d'huile maintenu à une température constante par un régulateur thermométrique.

* Microviscosimètre type Lecomte du Nouy, Eisenblaeter, ing. Lingolsheim (Bas-Rhin)

Dans la cuve, plonge un cylindre plein P, pendu à un fil métallique F, en série avec un galvanomètre à cadre mobile G. Sur le fil est monté un miroir M qui reçoit les rayons lumineux d'une source S et les renvoie sur un verre dépoli I, marqué en son milieu.

Aux bornes du galvanomètre sont branchés en série, une source de courant continu, un rhéostat R, et un milliampéremètre mA.

La cuve C, en tournant, a tendance à entraîner, par l'intermédiaire du liquide à étudier L, le cylindre P. Le fil F est soumis à un couple de torsion d'autant plus grand que la viscosité de L est plus grande, et le spot lumineux est dévié de sa position initiale d'équilibre en agissant sur le rhéostat qui fait varier le courant dans le galvanomètre G. On lit directement sur le milliampéremètre la valeur de la viscosité du liquide L en centièmes de centipoise (10^{-4} P) *.

Avant chaque expérience, on étalonne le viscosimètre en vérifiant que la viscosité de l'eau distillée trouvée en fonction de la température est bien celle donnée par les tables. Dans le cas contraire, on effectue le réglage grâce à la résistance interne du milliampéremètre. Un jeu de résistances permet de diviser l'intensité du courant par 2, 4, 8 et 16 de sorte que les viscosités mesurables s'étalent sur une très large bande de 0 à 1600×10^{-4} P.

B - LE SUBSTRAT. - Le mucoprotéide de la glande sous-maxillaire de boeuf a été préparé suivant Curtain et Pye (120). Cette méthode utilise la formation de composés insolubles avec des cations alcalino-terreux, en particulier le baryum, avec les mucoprotéines. Le produit obtenu, conservé lyophilisé, soumis à l'électrophorèse en tampon phosphate pH 6,9 0,066 M ne donne qu'un pic. Son spectre infrarouge, dans la région de 1 à 15 μ , avec prisme Na Cl (fig. 15) est superposable à celui enregistré par Gottschalk (208).

* La poise est la force de frottement de une dyne par cm^2 de surface lorsque le gradient de vitesse est égal à 1 cm par seconde.

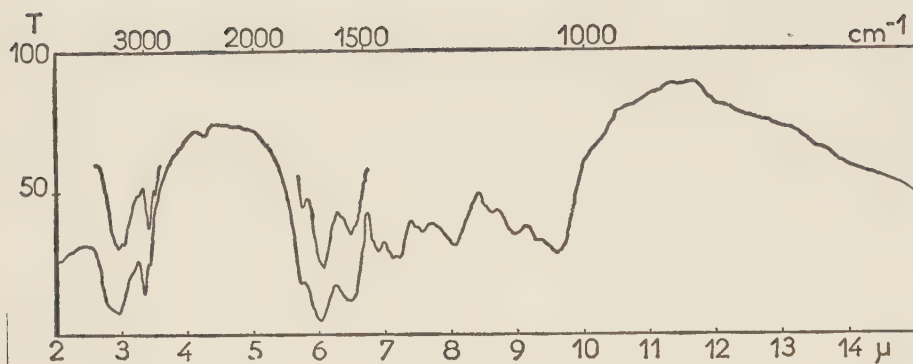


FIG. I5 - Spectre infrarouge du mucoprotéide de la glande sous-maxillaire de boeuf, préparé suivant la technique de Curtain et Pye (méthode au bromure de potassium, 1 g, pour 2 mg de produit lyophilisé, programme de fente 3, amplification 7,4, amortissement 5,6).

Le mucopolysaccharide est utilisé à la concentration de 0,5 p. 100 en solution tamponnée. Après dissolution sous agitation magnétique, on centrifuge à 3000 g pendant dix minutes. On recueille, pour nos réactions, la fraction comprise entre le culot de centrifugation et la phase nuageuse supérieure.

Des essais préliminaires montrent que le mucopolysaccharide s'hydrolyse spontanément en libérant l'acide sialique, d'une part aux pH supérieurs à 7,9 (tampon véronal sodique-acide chlorhydrique 0,2 N), d'autre part, aux pH inférieurs à 7 (tampon phosphate).

C - TECHNIQUE OPERATOIRE. - On place dans la cuve du viscosimètre, 4,5 ml d'une solution de mucopolysaccharide de glande sous-maxillaire de boeuf, à la concentration de 0,5 g p. 100 dans le tampon choisi. Au temps zéro, on ajoute la suspension virale sous un volume variant de 0,05 à 0,40 ml. On lit immédiatement sur le cadran la viscosité et on note ses variations en fonction du temps (lecture toutes les cinq minutes). Pour déterminer avec précision la viscosité initiale, il est nécessaire de faire un essai témoin où

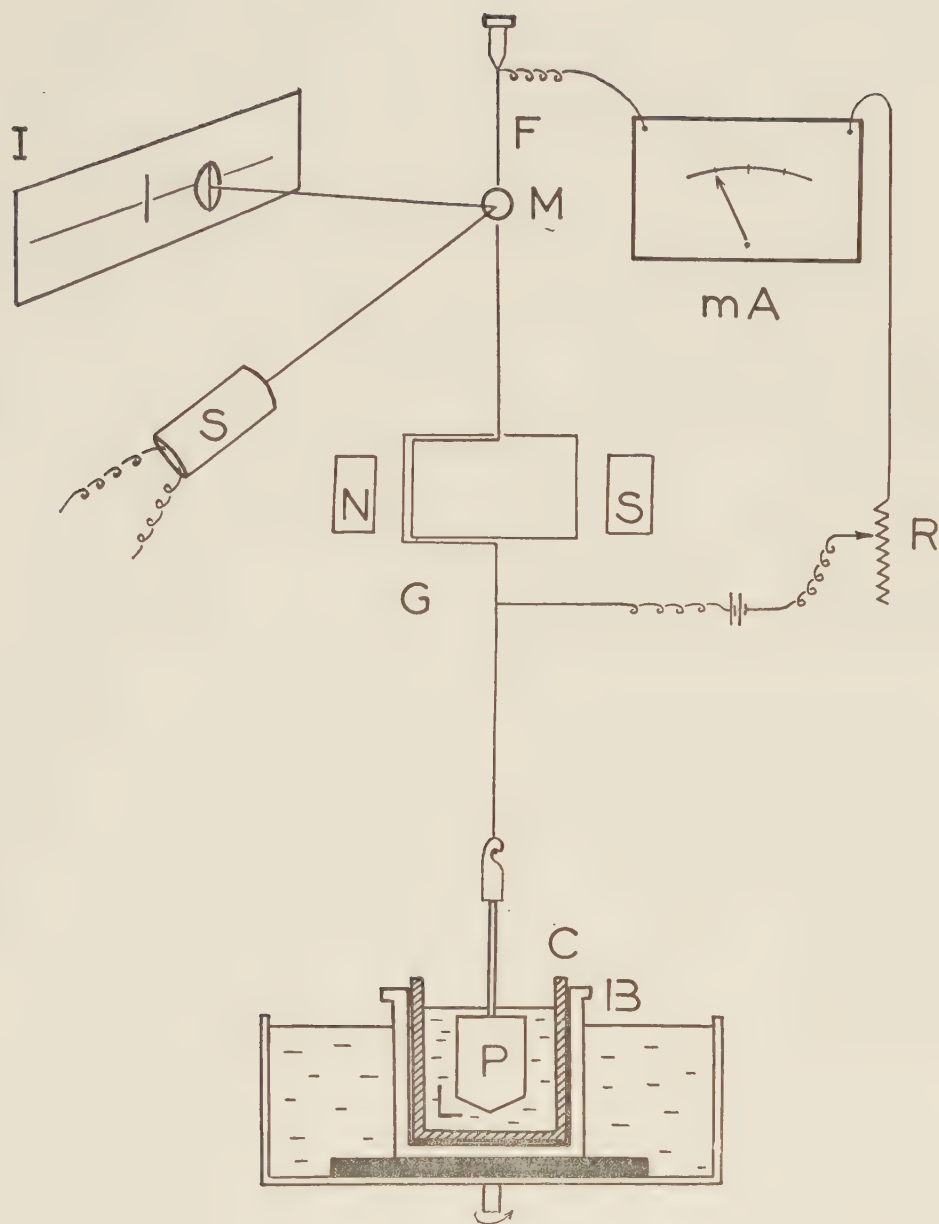


FIG. 14 - Schéma du microviscosimètre type Lecomte du Nouy.

la suspension virale est remplacée par une solution qui a servi à préparer celle-ci.

II - R E S U L T A T S

A - ACTION DU pH. - On utilise un lot de virus B purifié titrant 10240 Unités Hirst au ml. On note la baisse de viscosité obtenue au bout d'une heure dans des conditions d'équilibrage très strictes de température par rapport à l'essai témoin qui, habituellement, ne donne aucune baisse de viscosité après ce temps d'observation. Le tableau XIII montre que cette baisse est fonction du pH de la solution. En effet, la solution de mucopolysaccharide n'est pas stable aux pH extrêmes et il se produit une libération spontanée d'acide sialique que l'on peut vérifier, après neutralisation, par la méthode de Warren (65). La viscosité au temps 0 est d'ailleurs plus faible, La modification de la molécule est totale et irréversible.

Ce phénomène se retrouve facilement lorsqu'on ajoute, après une heure d'enregistrement de la viscosité, I à II gouttes de soude N à la solution du mucopolysaccharide au pH voisin de 7 (fig.I6).

B - ACTION DE LA CONCENTRATION VIRALE. - Si on effectue une série de mesures viscosimétriques avec des concentrations différentes de suspension virale et une solution de mucopolysaccharide en tampon phosphate 0,066 M pH 7,33, on observe, comme l'indique la figure I7, une baisse de viscosité d'autant plus marquée que la concentration est plus élevée.

Ce phénomène est bien en relation avec le virus, puisqu'il ne se manifeste pas lorsque ce dernier est inactivé par chauffage 30 minutes à la température de + 56°C, ("virus indicator" des Anglo Saxons).

C - ACTION DU CALCIUM. - On utilise une solution de mucoprotéine à 0,5 % en tampon acide borique 0,2 M - borax 0,05 M, auquel on ajoute préalable-

Solution tampon	pH	pH final	baisse de viscosité (η) en I/100 ème de centipoise
Phosphate disodique- monopotassique 0,066 M	5,92	5,83	$(\eta_T - \eta_R)_t$ 60 mn
			0
- id -	6,50	6,40	0
- id -	6,98	6,93	27
- id -	7,33	7,28	26
- id -	7,87	7,56	20
borax (0,05 M) + acide borique (0,2 M)	8,56	8,48	19
-id -	8,93	8,82	10
- id -	10,51	10,07	0

Tableau XIII - Action du pH sur la baisse de viscosité
(exprimée en centièmes de centipoise) obtenue après 1 h d'observation.

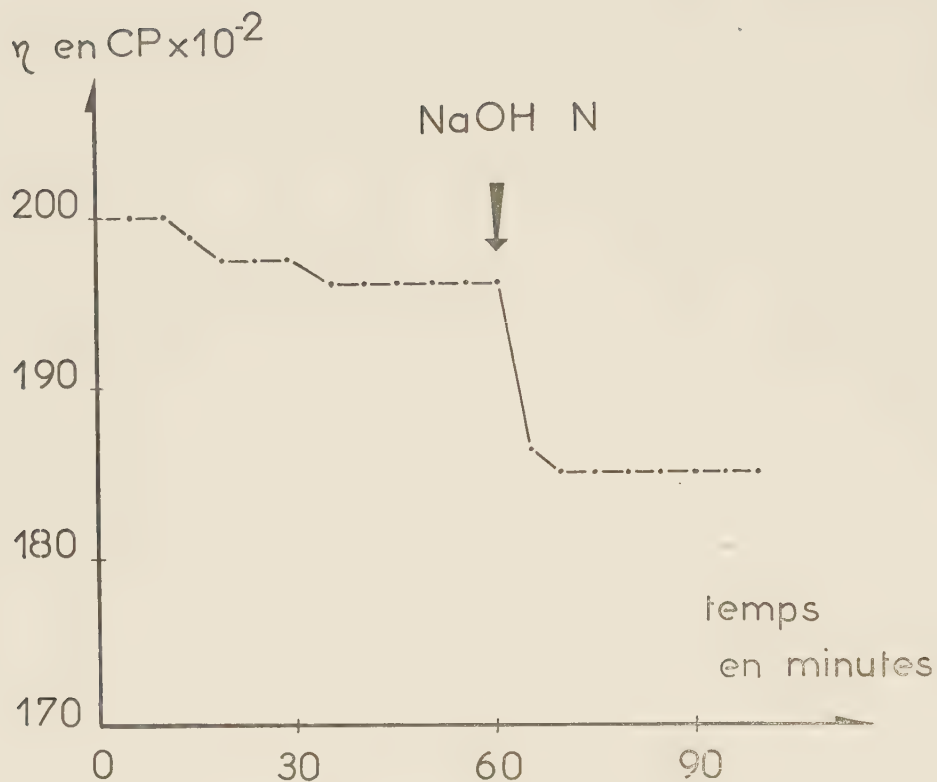


FIG. I6 - Action d'une goutte de soude N sur la viscosité d'une solution en tampon phosphate 0,066 M pH 7, de mucopolysaccharide de glande sous-maxillaire de boeuf (en abscisses, le temps en minutes, en ordonnées, la viscosité η en centièmes de centipoise).

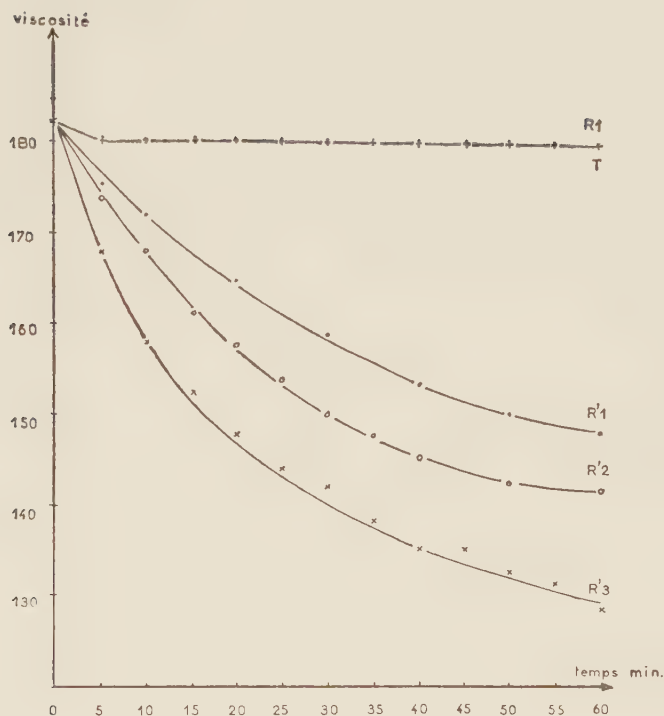


FIG. I7 - Effet de M. influenzae B sur la viscosité des solutions de mucopolysaccharide en fonction du temps (en abscisses, le temps en minutes ; en ordonnées, la viscosité en centièmes de centipoises). R_I : lot de virus purifié (0,50 ml d'une suspension titrant 10 240 unités Hirst par millilitre) préparé à partir de liquides allantoïques infectés, mais limpides lors de la récolte ; R'_I : lot de virus B purifié (0,25 ml d'une suspension titrant 10 240 unités Hirst par millilitre) préparé à partir de liquides allantoïques louches au moment de la récolte ; R'_2 : mêmes conditions que R'_I , mais 0,50 ml de virus ; R'_3 : mêmes conditions que R'_I , mais 1 ml de virus ; T : mêmes conditions que R'_I , mais le virus a été préalablement chauffé trente minutes à 56° .

ment une solution de chlorure de calcium dont la molarité finale varie de 0,1 M à 0,0001 M, dans le rapport $\frac{1}{30}$ du volume total. A 4,5 ml de cette solution contenant des ions Ca^{++} à concentration variable, on ajoute, au temps 0, 0,5 ml de virus purifié. La fig. 18 nous montre que la viscosité au temps 0 est fonction de la concentration des ions Calcium et qu'après 60 minutes d'enregistrement, cette viscosité est voisine, dans tous les cas.

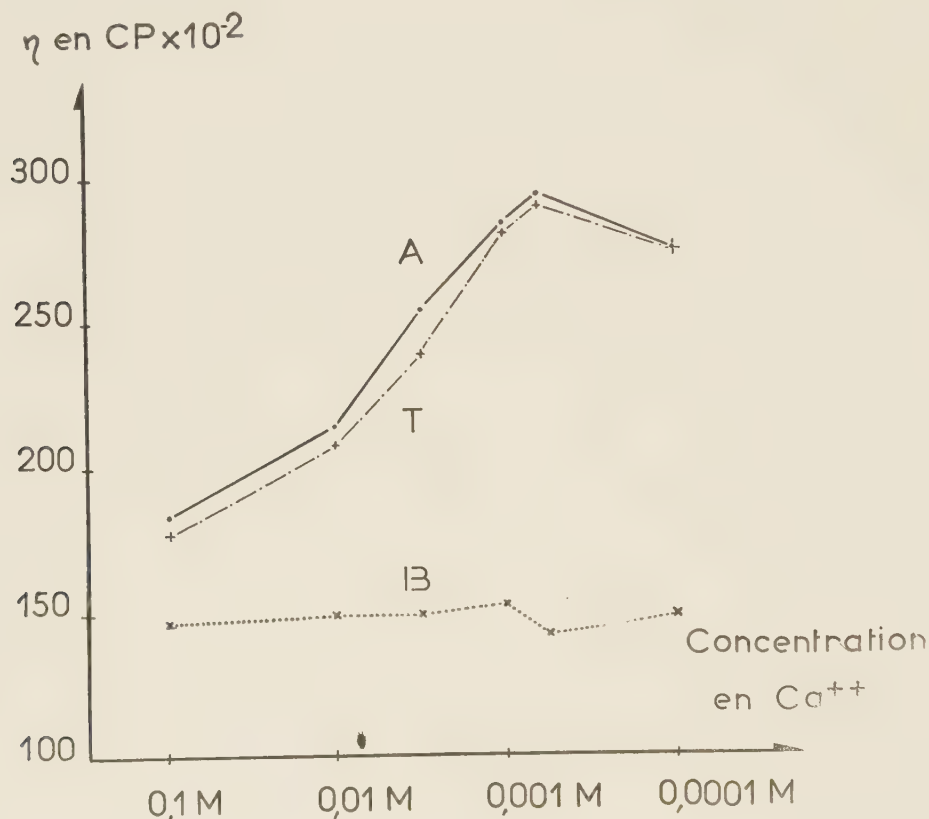


FIG. 18 - Influence des ions Calcium sur la viscosité d'une solution de mucopolysaccharide, avant (A) et après (B) un contact de 60 minutes avec une suspension virale de Myxovirus influenzae B,

T, courbe témoin avec virus inactivé pendant 30 minutes à $+56^\circ\text{C}$ (en abscisses, concentration en ions Calcium en échelle logarithmique descendante, en ordonnées, viscosité en centièmes de centipoise).

D - INFLUENCE DES LIPIDES EN SOLUTION. - En réalité, nous avons constaté que seuls les lots de virus provenant de liquides allantoïques louches se montraient capables d'effet sur la viscosité. Ce phénomène ne se manifeste que lorsque le virus était en présence de lipides en suspension dans le liquide allantoïque. Il suffit de souiller volontairement ce liquide par des traces de vitellus pour obtenir un virus actif. L'addition de cholestérol à une suspension virale provoque de même une chute considérable de la viscosité, bien que ce lipide soit inactif en l'absence de particules virales (fig. I9).

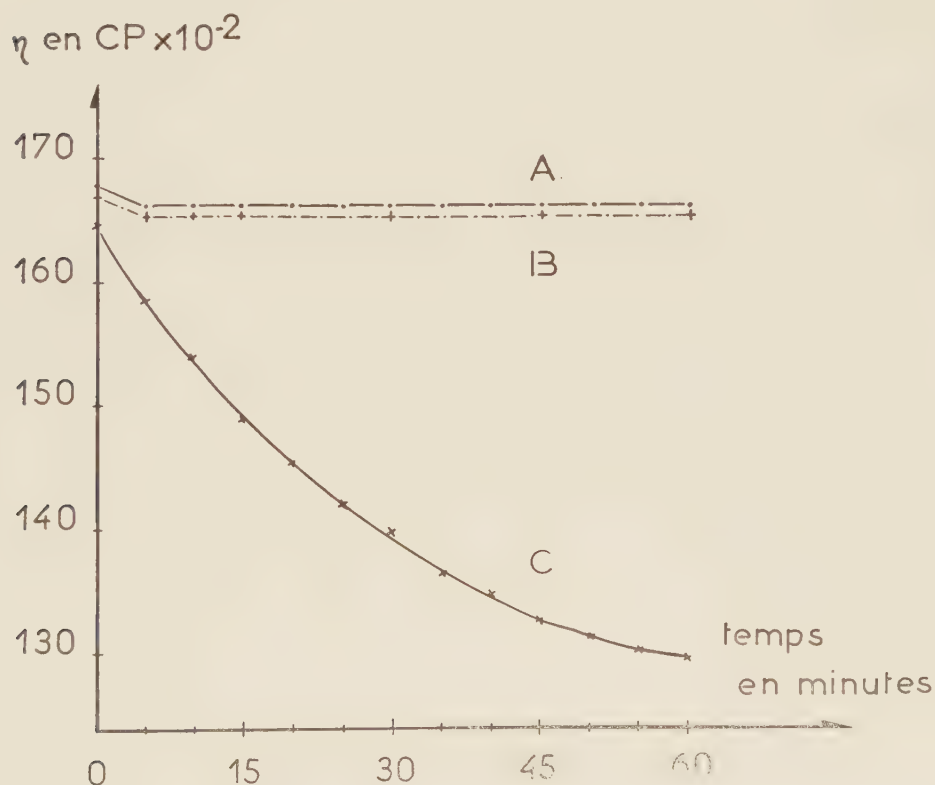


FIG. I9 - Influence du cholestérol sur la viscosité,
A, Virus B seul
B, Cholestérol sans virus
C, virus B + cholestérol.

III - D I S C U S S I O N

Si les techniques viscosimétriques se sont révélées inutilisables pour suivre l'activité neuraminidasique, elles ont permis en revanche d'attirer l'attention sur l'aptitude des particules virales à adsorber des lipides provenant du vitellus de l'oeuf, phénomène qui peut être la cause de grosses erreurs dans l'étude analytique des lipides constitutifs des particules virales.

En l'absence d'une contamination par le vitellus de l'oeuf, les Myxovirus ne provoquent aucune modification de la viscosité des solutions de mucopolysaccharide. Ils provoquent au contraire une baisse rapide et considérable de celle-ci, s'ils ont été mis en présence de vitellus ou d'un lipide tel que le cholestérol.

On sait que les Myxovirus sont particulièrement riches en lipides et que ceux-ci se trouvent localisés dans l'enveloppe externe des particules virales. Les observations précédentes montrent que celles-ci sont capables d'adsorber certains lipides contenus dans le vitellus de l'oeuf, ou encore d'adsorber du cholestérol. Leur affinité pour le mucopolysaccharide s'en trouve alors considérablement modifiée, au point de provoquer dans ce cas une chute rapide et considérable de la viscosité des solutions de cette substance.

Ceci montre combien l'interprétation des propriétés des Myxovirus est délicate, et quelle importance il faut attacher à l'origine du virus et aux conditions de purification.

CHAPITRE CINQUIEME

METHODE DE TITRAGE DU POUVOIR NEURAMINIDASIQUE DE MYXOVIRUS INFLUENZAE B (souche Lee) ET DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I (virus Sendai)

La technique de viscosimétrie ne nous permettant pas de mettre au point une méthode de titrage du pouvoir enzymatique, nous avons étudié les caractères des cinétiques d'hydrolyse par les Myxovirus de la mucoprotéine de la glande sous-maxillaire de boeuf et d'un substrat plus simple, l'acide 3' lactose-lactaminique.

I - CARACTERES DE LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DE L'ACIDE 3' LACTOSE LACTAMINIQUE PAR MYXOVIRUS INFLUENZAE B ,souche LEE.

A - L'ACIDE 3' LACTOSE -LACTAMINIQUE (A.L.L.).- Nous avons préparé l'ALL successivement par les méthodes de Kuhn et Brossmer (140) et de Heimer et Meyer (148) à partir du colostrum de vache recueilli pendant les trois premiers jours après le vêlage.

La méthode de Kuhn s'est révélée plus longue, plus délicate et de moins bon rendement que celle de Heimer et Meyer. Ces deux méthodes ont en commun d'extraire les cations du colostrum écrémé et dialysé, sur résines échangeuses d'ions (Amberlite IR-120 ou Dowex -50) après s'être débarrassé des chlorures et des sulfates par l'acétate de baryum à 15 %; puis de fixer l'ALL sur une autre résine échangeuse d'ions (Lewatit MIH ou Dowex I), tandis que le lactose et les autres hydrates de carbone ne sont pas retenus.

L'élution de l'ALL est obtenue , dans le premier cas, par l'acétate de sodium 0,05 M et , dans le second, par un gradient d'acide formique 0,1 N -0,01 N. Fortement hygroscopique, le produit obtenu par l'une ou l'autre

méthode, lyophilisé, devient rapidement visqueux au contact de l'air. Mayron et Tokes (209) avaient déjà signalé cette avidité pour l'eau.

Le degré de pureté des produits recueillis est déterminé par chromatographie descendante sur papier Whatman n° I en N-butanol/pyridine/eau (3:2:1,5). Nous avons utilisé pour la révélation, le réactif de Saroja (210, 211) qui est une solution acétonique de phosphate d'aniline et de diphenylamine. Ce réactif présente l'avantage de permettre la distinction avec une bonne sensibilité entre les acides sialiques qui se colorent en rouge et l'ALL qui se colore en bleu.

Les oses, le lactose en particulier, se colorent également en bleu. Le fond du chromatogramme est gris clair si la révélation est effectuée correctement (cinq à dix minutes à l'étuve à 100°C). Un chauffage excessif amène rapidement le noircissement du papier.

Le professeur Kuhn a bien voulu nous adresser un échantillon d'acide lactose-O-acétyl-lactaminique qui nous a servi de témoin. Les chromatogrammes des produits que nous avons obtenus par les méthodes précédentes mettent en évidence une série de taches. On reconnaît (fig. 20, I et 2) une tache principale bleu foncé (a) dont le R_{lactose} est de 0,43, une tache bleue moins importante (b) dont le R_{lactose} est de 0,20 et une tache rouge (c) d'acide sialique libre dont le R_{lactose} est de 0,56.

L'échantillon d'acide lactose-O-acétyl-lactaminique que nous a procuré Kuhn montre (fig. 20, 3), une tache principale (a) de R_{lactose} 0,43, deux taches peu importantes de R_{lactose} 0,20 et 0,10, une tache rouge plus petite (c) d'acide sialique libre de R_{lactose} 0,56 et une tache bleue (d) de R_{lactose} I qui correspond à une faible quantité de lactose présent dans le produit.

Afin d'obtenir un substrat rigoureusement pur, et en particulier exempt d'acide sialique libre, nous avons essayé la méthode préconisée par Heimer et Meyer (148) par dissolution dans le méthanol et précipitation par l'acétone. Nous avons également essayé de fixer l'ALL sur Dowex IX8 (50 - 100

mesh, forme formiate) suivie de l'élution sur collecteur de fractions par un gradient d'acide formique variant entre 0 et 0,6 N. Ces deux procédés ne se sont pas montrés satisfaisants.

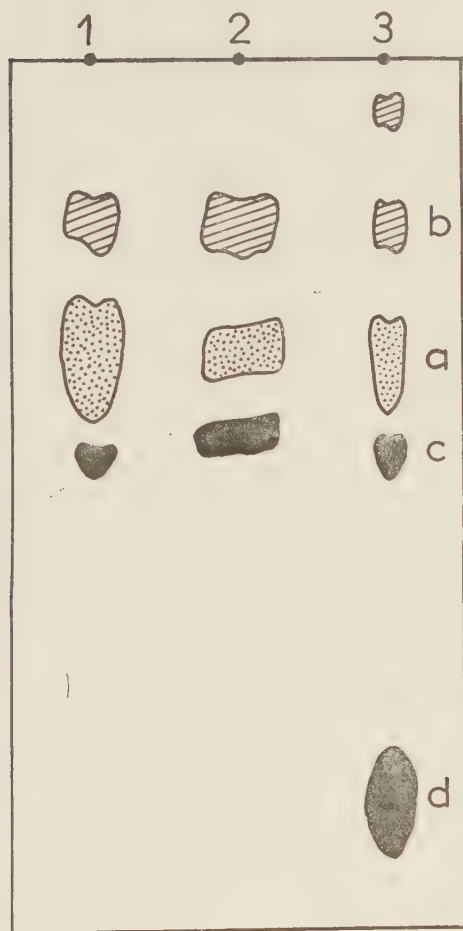


FIG. 20- Chromatographie descendante sur papier Whatman n°1, N-butanol/pyridine/eau (3:2:1,5),
1 - ALL préparé selon Heimer et Meyer,
2 - ALL préparé selon Kuhn,
3 - Acide lactose-O-acétyl lactaminique témoin.

Nous avons alors eu recours à la chromatographie sur papier Whatman n°1 (descendante, N-propanol/acétate d'éthyle/eau, 7:1:2). Le produit à purifier est déposé en trait continu sur toute la largeur de la feuille. La durée de la chromatographie est de quarante huit heures. Deux étroites bandes verticales sont alors découpées à droite et à gauche de la feuille de papier et soumises au réactif

de Saroya (210). On localise ainsi les bandes de migration sur la partie centrale de la feuille. Ces bandes sont découpées et éluées par l'eau distillée. Les liquides d'élution des mêmes taches, pour une série de chromatogrammes, sont réunis et lyophilisés. Nous obtenons ainsi, à partir des taches de $R_{\text{lactose}} 0,54$ dans ce solvant, une poudre légère, blanche, non hygroscopique (fig.21) et dont le spectre infrarouge, représenté par la figure 22, est caractéristique.

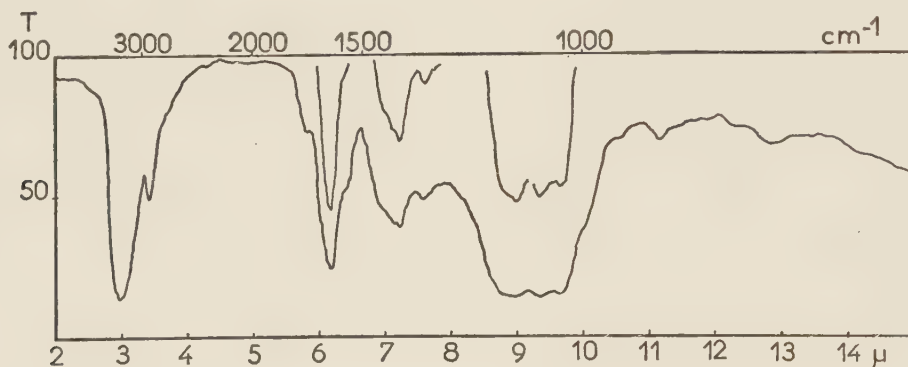


FIG.22 - Spectre infrarouge de l'acide 3'lactose-lactaminique
(3 mg de produit lyophilisé pour 1 g de bromure de potassium).

On remarque en effet, après les vibrations de valence des groupements hydroxyliés liés (ν OH) à 3μ (3333 cm^{-1}) et le doublet des vibrations antisymétrique et symétrique des CH à $3,42 \mu$ (2924 cm^{-1}) et à $3,51 \mu$ (2849 cm^{-1}), le ν C=O du COOH libre de l'acide lactaminique à $5,80 \mu$ (1725 cm^{-1}) suivi du ν C=O du groupement O-acétyl à $5,82 \mu$ (1718 cm^{-1}).

Le groupement acétamide présente une bande de vibration de valence ν C = O à $6,20 \mu$ doublée d'une bande de vibration de déformation δ NH à $6,40 \mu$ (1563 cm^{-1}). La bande représentative des déformations de CH du groupement CH_3 (δ CH) est présente à $7,25 \mu$ (1379 cm^{-1}).

Enfin, entre 9 et 10μ (1111 et 1000 cm^{-1}) on retrouve les vibrations ν C - C et ν C - O, du cycle des oses.



FIG. 21 - Photographie de l'acide lactose-lactaminique sur le fond d'un ballon, après lyophilisation.

Rechromatographiée dans différents solvants elle se comporte comme un produit pur (fig. 23).



FIG. 23 - Chromatographie descendante sur papier Whatman n° I, pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau 5 : 5 : I : 3, 1, lactose témoin 2, ALL purifié et rechromatographié.

Elle est hydrolysable par la neuraminidase du virus de la grippe.

Quelques faibles (quelques dizaines de milligrammes par opération) les quantités d'ALL ainsi obtenues sont suffisantes pour permettre des séries de mesure de l'activité neuraminidasique. De plus, le procédé est simple, reproductible aussi souvent qu'il est nécessaire.

L'identification de ce produit a été réalisée grâce à la méthode à l'anthrone de Scott et Melvin (2I2) pour doser le lactose sans hydrolyse préalable, et à la méthode arsénimolybdique de Nelson (2I3) pour déterminer le pouvoir réducteur. La détermination des fonctions esters (groupe O-acétyl) par la méthode de Hestrin (2I4) donne un résultat négatif. Enfin, les groupements N-acétyl ont été recherchés par la méthode de Ludwig et Dorfmann (2I5).

Les résultats de ces dosages sont rassemblés dans le tableau XIV où ils sont comparés à ceux publiés par d'autres auteurs. Les valeurs théoriques sont rapportées à l'acide lactose-lactaminique mono-acétylé, de poids moléculaires 633,47.

L'acide lactose-O-acétyl-lactaminique possède deux groupes acétyl dans sa molécule, l'un sous forme ester (O-acétyl), l'autre lié à l'azote aminé (N-acétyl). Le produit qui nous a été adressé par le Professeur Kuhn et que nous avons utilisé comme témoin de chromatographie nous a montré (fig.20) une tache principale qui, dans tous les solvants essayés, présente la même mobilité que l'acide lactose-lactaminique-mono-acétylé que nous avons préparé. Il faudrait donc admettre que ces deux substances ont des mobilités chromatographiques tout à fait voisines, ou bien que l'acide lactose-O-acétyl-lactaminique a perdu, dans l'échantillon que nous avons en notre possession, le groupement O-acétyl.

L'ensemble de ces difficultés fait que l'on ne saurait trop insister sur la nécessité, pour l'étude des caractères enzymatiques des Myxovirus, de préciser la pureté et l'identité des substrats utilisés.

Les caractéristiques chromatographiques de l'acide lactose-N-acétyl-lactaminique purifié * que nous avons obtenu sont résumées dans le tableau XV.

* Remarque : l'A.L.L. purifié est commercialisé actuellement sous le nom de Neuramin lactose, SIGMA Chemical Company, 3500 DE KALB ST. St-LOUIS 18, MO. U.S.A., 12 LETTICE ST., LONDON S.W. 6 ENGLAND.

	Valeurs théoriques	Résultats personnels	Résultats d'autres auteurs
Lactose	54,2 %	45 %	48,2 % (Heimer, méthode à l'anthrone) 47 % (Trucco, méthode à l'anthrone)
Pouvoir réducteur		36 % (exprimé en lactose par rapport à la prise d'essai) 17,5 % (exprimé en glucose par rapport à la prise d'essai) 79 % (exprimé en lactose par rapport au lactose déterminé par l'anthrone)	31, 43, 34, 41, 27, 23 33 % (Heyworth, méthode de Nelson) 27,1 % (Heimer, méthode de Hagedorn et Jensen) 81,7, 82,8, 82 % (Trucco)
Acide N-acétyl neuraminique	48,8 %	42,5 %	43 % (Heimer, méthode de Bial et au R. d'Ehrlich) 43 % (Trucco, méthode de Bial)
Rapport : $\frac{\text{ANAN}}{\text{lactose}}$	0,90	0,94	
Fonction ester (groupe O-acétyl)	0	0	Kuhn : I groupe O-acétyl
Ac. acétique sous forme N-acétyl	6,8 %	6,72 ; 7,05 ; 7,2 %	6,4 % (Heimer)
Groupe acétyl par molécule d'ALL	I (2 pour 1'acide lactose-O-acétyl lactaminique de Kuhn)	I	I (Heimer) 2 (Kuhn)

Tableau XIV - Comparaison entre nos résultats personnels concernant l'analyse de l'acide 3' lactose-lactaminique et ceux d'autres auteurs.

- Heimer (R) and Meyer (K) - B.B.A., 1958, 27 , 490.
- Trucco (R.E.) and Caputto (R) - J. biol. Chem., 1954, 206, 901.
- Heyworth (R) and Bacon (J.S) - Biochem. J., 1957, 66, 41.
- Kuhn (R) - Bull. Soc. Chim. biol., 1958, 40 , 308.

SOLVANT	R _{lactose} de l'acide lactose-lactaminique
N-butanol/pyridine/eau, 3 : 2 : 1,5.....	0,43 - 0,44
N-propanol/acétate d'éthyle/eau, 7:1:2....	0,54
Pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/ eau, 5:5:1:3.....	0,51
R _{lactose} de l'acide lactose-lactaminique purifié, dans différents systèmes-solvants (papier Whatman numéro 1, chromatographie descendante).	

Tableau XV - Caractéristiques chromatographiques de l'acide lactose-N-acétyl neuraminique.

Après hydrolyse acide (SO_4H_2 0,25 N) en bain marie bouillant pendant dix minutes puis neutralisation par la baryte, nos préparations d'ALL ne montrent plus qu'une tache de lactose ($R_{\text{lactose}} = 1$) et une tache rouge d'acide sialique de $R_{\text{lactose}} = 0,56$ (fig. 24). Le temps d'hydrolyse a été déterminé au préalable en effectuant des prélèvements à intervalles réguliers (fig. 25). Cette valeur de 0,56 a été retrouvée pour l'acide neuraminique que nous avons préparé de la manière suivante :

- 20 g de mucoprotéine de glande sous-maxillaire de boeuf sont hydrolysés par 400 ml d'acide sulfurique 0,03 N, à la température de + 80°C, pendant une heure. Les acides sialiques sont séparés suivant le procédé de Svennerholm (169). Après neutralisation par l'hydroxyde de baryum et filtration, on élimine les cations sur Dowex 50 (50-100 mesh) forme acide, puis on adsorbe l'acide N-acétylneuraminique sur Dowex IX2. L'acide formique 0,3 N déplace les acides sialiques et le liquide d'élution est recueilli au collecteur, par fractions de 10 ml.

La mise en évidence de ces acides sialiques est effectuée par la

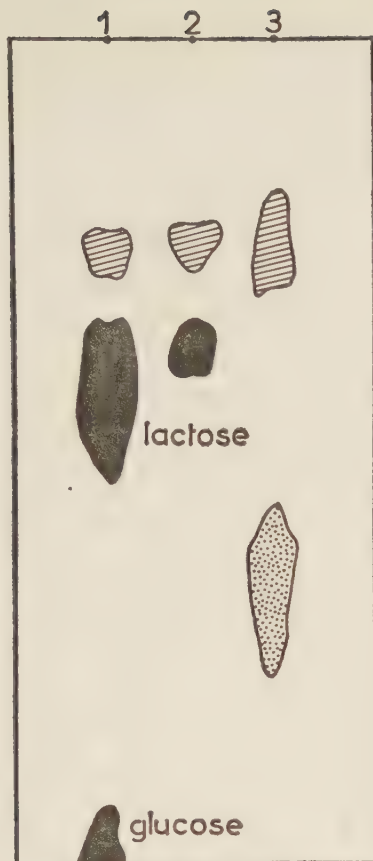


FIG. 24 - Chromatographie descendante sur papier Whatman n° I, N-butanol/pyridine/eau 3 : 2 : 1,5,

- I - A.L.L. hydrolysé additionné de lactose et de glucose,
- 2 - A.L.L. hydrolysé,
- 3 - Acides sialiques témoins, acide N-acétyl-neuraminique et acide O-N-diacétylneuraminique.

méthode de Warren (65) à l'acide thiobarbiturique. On obtient un pic bien défini entre la 80ème et la 100ème fraction.

Après lyophilisation, la cristallisation dans l'alcool éthylique-eau (90 : 10 (v/v), auquel on ajoute de l'éther par petites fractions pour avoir un rendement maximum en produit cristallisé, permet d'obtenir des touffes d'aiguilles (fig. 26) qui, par chromatographie sur papier s'avèrent constituer un produit pur, alors que les eaux mères, après lyophilisation, laissent un résidu qui est un mélange de quatre acides sialiques différents. Le produit cristallisé donne toutes les réactions des acides sialiques, en particulier les réactions caractéristiques avec le réactif de Bial, celui d'Ehrlich, et le réactif à la résorcine.

B - CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE.

LE SUBSTRAT. - L'ALL purifié est conservé sous vide en présence d'anhydride phosphorique. On en fait une solution dans l'eau bidistillée à partir de laquelle on prépare des dilutions dont les concentrations varient entre 100 et 1000 µg/ml. La solution mère est conservée congelée.

SOLUTION TAMPONNEE. - Dans une première série de travaux, (Mathieu, Colobert et Fontanges (64)), nous avons utilisé la solution "tris" (trihydroxyméthylaminométhane)*. Nous avons trouvé un pH optimum de 6,8. Celui-ci étant voisin de la limite inférieure donnée par ce tampon, il était permis de douter du pouvoir du tampon lors des variations de pH engendrées par les produits d'hydrolyse de la réaction enzymatique.

Nous avons repris nos expériences avec les solutions tamponnées phosphate monosodique- disodique 0,2 M entre 5,97 et 7,35 et cacodylate de soude - H Cl entre 5,58 et 6,90. Le pH est contrôlé au pH mètre.

LE VIRUS. - La suspension mère de virions est un tampon phosphate 0,3 M de pH 7,0. Elle est utilisée immédiatement après chromatographie sur colonne de phosphate de calcium, son titre étant ajusté selon les besoins, par dilution dans le même tampon phosphate. Le pouvoir hémagglutinant, exprimé en unités Hirst est titré vis-à-vis d'hématies humaines du groupe O Rh+.

REACTION. - Tous nos essais ont été effectués sous le volume de 2,5 ml dans un thermostat réglé à la température de + 37°C, avec agitation constante.

* Tampon "tris" : 50 ml de solution 0,2 M de trihydroxyméthylaminométhane + quantités variables de H Cl 0,2 N suivant le pH désiré + q.s.p. 200 ml d'eau bidistillée.

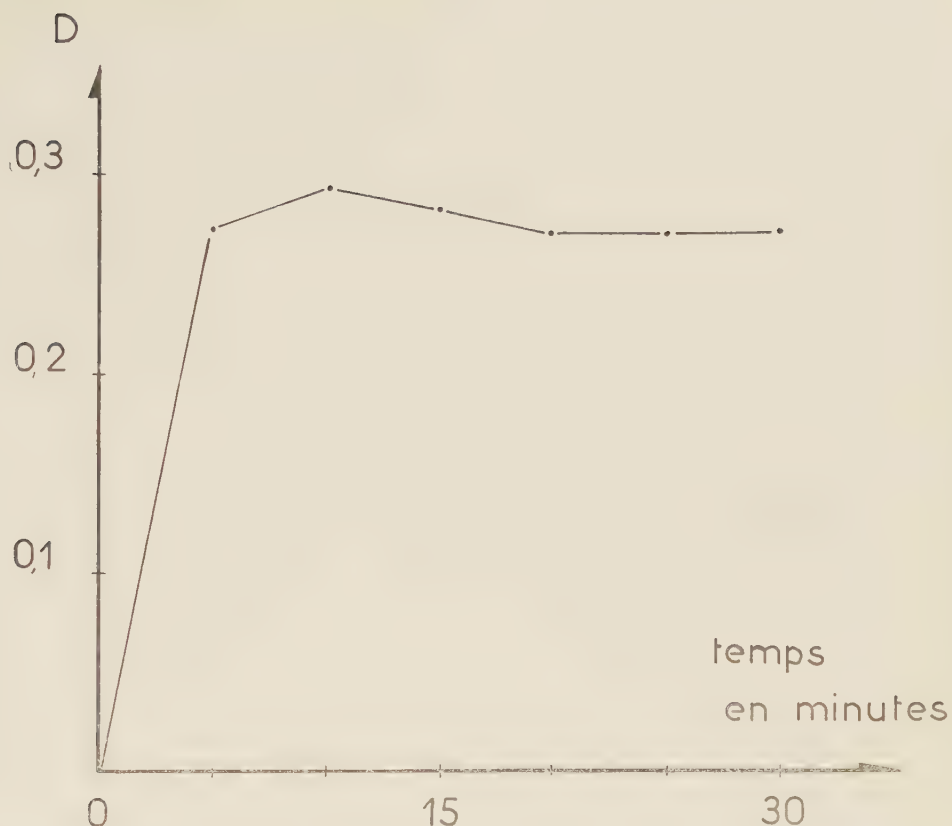


FIG. 25 - Libération de l'acide sialique en fonction du temps d'hydrolyse acide (SO_4H_2 0,08 N, bain marie à + 100°C), à partir de l'A.L.L. purifié, en ordonnées, densité optique à 549 m μ (méthode de Warren).

Solution d'ALL..... 1 ml
Solution tamponnée..... 1 ml
Suspension virale..... 0,5 ml

La solution tamponnée du substrat et la suspension du virus sont préalablement équilibrées séparément à la température de + 37°C. Au temps 0 et à des intervalles de temps choisis et variables selon les concentrations en substrat et en enzyme, des prélèvements de 0,2 ml sont effectués. On arrête l'hydrolyse enzymatique en plongeant le tube contenant le prélè-

vement dans un mélange d'alcool méthylique et de glace carbonique à la température de -75°C , ce qui permet de différer le dosage des produits de la réaction. On peut également bloquer la réaction en plongeant pendant cinq minutes le tube contenant le prélèvement dans un bain-marie bouillant. On procède alors au dosage de l'acide N-acétyl-neuraminique libéré suivant la technique de Warren (65).

Nous rappellerons que cette méthode consiste à mettre en contact pendant vingt minutes, à la température du laboratoire, 0,2 ml d'un échantillon avec 0,2 ml de solution de métaperiodate de sodium * puis à ajouter 1 ml de solution d'arsenite de sodium ** en agitant jusqu'à disparition de la teinte jaune brun. La coloration due à l'oxydation des acides sialiques (production d'aldéhyde malonique) étant augmentée en milieu acide, on ajoute 3 ml d'acide 2-thiobarbiturique *** puis on porte au bain-marie bouillant pendant quinze minutes. Après passage des tubes dans l'eau froide pendant cinq minutes, on extrait la coloration rose par 4,3 ml de cyclohexanone ****. Après agitation suivie de centrifugation à 3000 g pendant dix minutes, on élimine l'opacité nuageuse en réchauffant le tube dans un bain-marie à la température de $+37^{\circ}\text{C}$ plutôt que de mélanger la phase organique à une concentration de 2,5 p. 100 d'acétone comme le conseillent Jacobs et Walop (216). L'intensité de la coloration est mesurée à la longueur d'onde de 549 m μ par spectrophotométrie.

Pour le dosage, on utilise la formule de Warren qui donne la concentration d'acide N-acétylneuraminique en fonction de la densité optique à la longueur d'onde de 549 m μ :

$$\text{ANAN (micromoles)} = 0,075 D_{549 \text{ m}\mu}$$

* métaperiodate de sodium 0,2 M Merck en acide phosphorique 9 M.

** arsenite de sodium 10 %, en solution de sulfate de sodium 0,5 M - SO_4H_2

0,1 N.

*** acide 2-thiobarbiturique (purum, "Fluka A.G. Chemische Fabrik"

Buchs S.G.) à 0,6 % en solution de sulfate de sodium 0,5 M.

**** cyclohexanone "Prolabo".

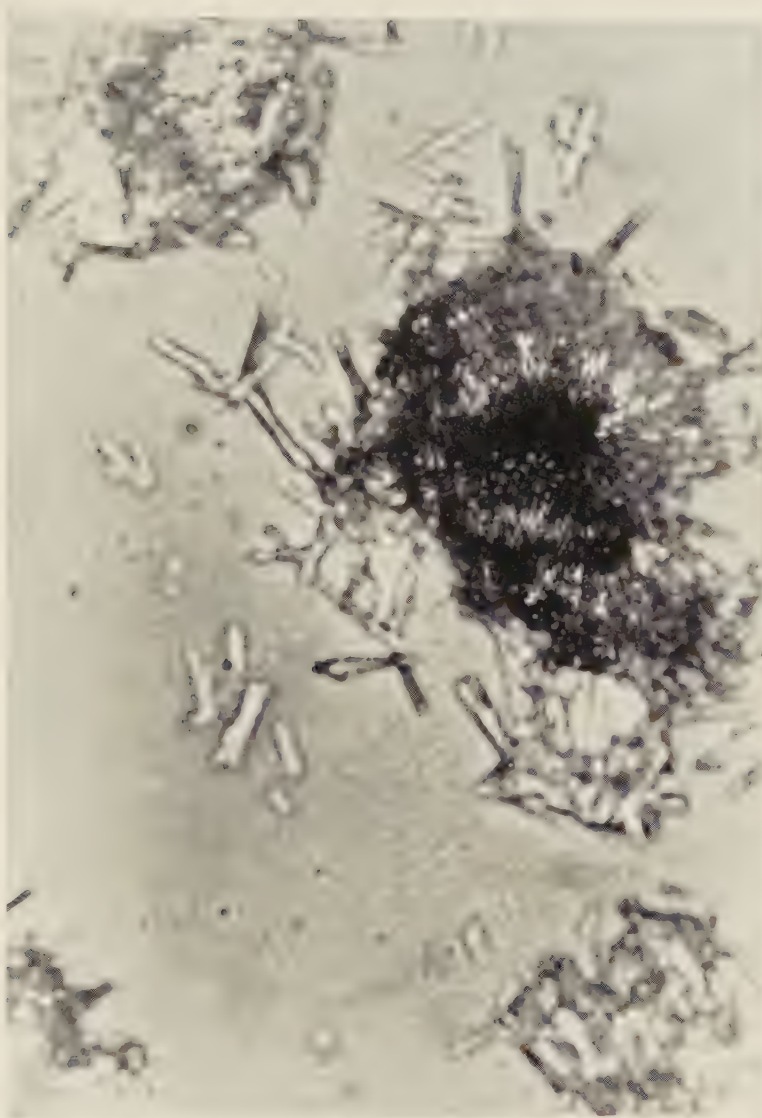


FIG. 26 - Cristaux d'acide
N - acétyl neuraminique.

que l'on peut corriger par une mesure à 532 m μ quand on suspecte une influence parasite du desoxyribose :

$$\text{ANAN (micromoles)} = 0,090 \text{ Do}_{547 \text{ m}\mu} - 0,033 \text{ Do}_{532 \text{ m}\mu}.$$

On peut aussi se reporter à une courbe d'étalonnage préalablement établie.

Nous avons vérifié que, dans nos conditions expérimentales, seul l'acide N-acétyl-neuraminique libre intervient dans la formation de la coloration rouge avec un maximum d'absorption à 549 m μ , l'ANAN combiné dans l'ALL n'interfère pas.

Nous avons également vérifié que la représentation des variations de la densité optique en fonction de la quantité d'ANAN présent dans la prise d'essai (0,2 ml) est une droite jusqu'à une densité optique de 0,50 environ (0,05 micromole d'ANAN).

C - R E S U L T A T S.

ACTION DU pH. - La figure 27 nous montre que le pH optimum se situe, pour les tampons cacodylate et phosphate entre 5,8 et 6,3 alors qu'il est voisin de 7 pour le tampon "tris".

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT. - Afin de déterminer la constante de Michaelis, on a étudié, pour une concentration fixe de virus, l'influence de la concentration en substrat sur la vitesse initiale d'hydrolyse. La figure 28 concrétise les résultats. Le calcul de la constante de Michaelis est représenté sur la figure 29 pour deux préparations distinctes de virus, obtenues par chromatographie sur colonne de phosphate. Les deux droites ainsi déterminées convergent sur le même point des abscisses qui indiquent la valeur de $-1/K_m$, K_m étant la constante de Michaelis (217).

$$\text{On trouve } K_m = 2,75 \times 10^{-4} \text{ M}$$

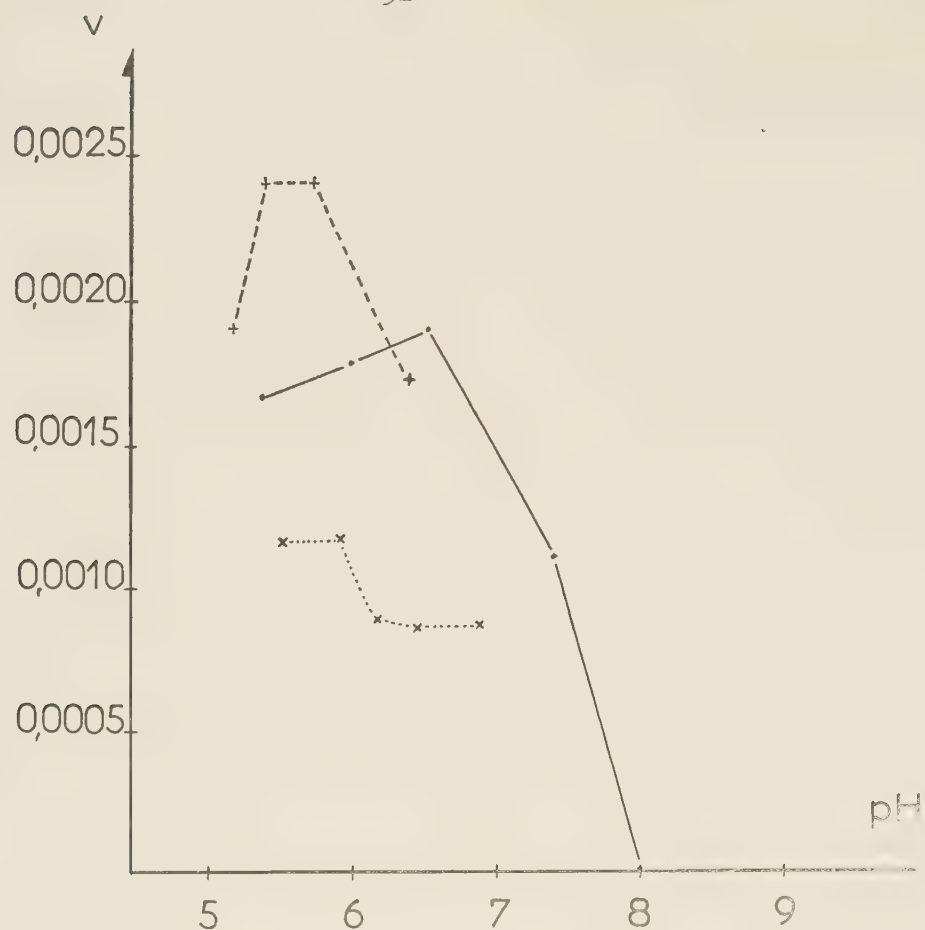


FIG. 27 - Recherche du pH optimum pour l'hydrolyse de l'ALL par le virus. En ordonnées, vitesse initiale exprimée en micromoles d'ANAN libéré/millilitre/minute,

.———., tampon "tris",
 +— — —+ , tampon cacodylate,
 x.....x, tampon phosphate.

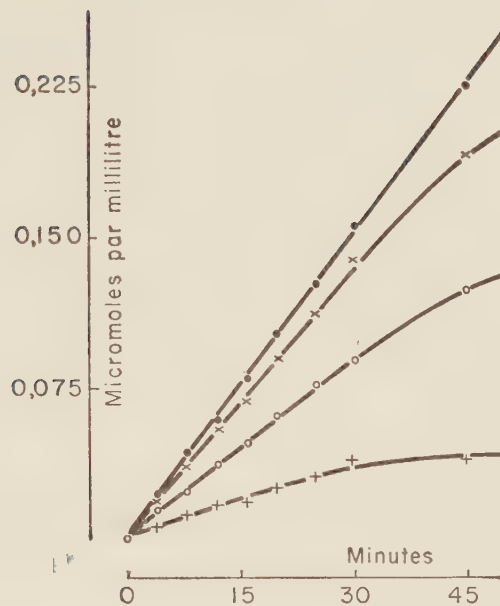


FIG. 28 - Influence de la concentration du substrat sur la vitesse d'hydrolyse. Les concentrations d'ALL sont de I23 (+—+), 492 (o — o) 86I (x—— x) et I230 (o—o) microgrammes/2,5 ml, soit de 0,077 micromoles/ml à 0,777 micromoles/ml.

La concentration du virus est de 256 unités Hirst/ml.

En abscisses, le temps en minutes, en ordonnées l'ANAN libéré, exprimé en micromoles/ml.

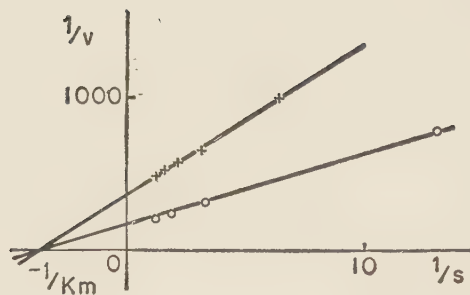


FIG. 29 - Calcul graphique de la constante de Michaelis sur un lot de virus B, purifié par chromatographie sur colonne de phosphate de calcium.

En abscisses, les inverses des concentrations de substrat exprimées en micromoles/ml ;

En ordonnées, les inverses des vitesses initiales exprimées en micromoles d'ANAN libérées/ml/mn.

Les deux droites, obtenues avec deux concentrations différentes de virus (256 et 64 unités Hirst/ml), coupent l'axe des abscisses au même point qui indique $-1/K_m$.

Le calcul donne :

$$K_m = 2,75 \times 10^{-4} M.$$

Une nouvelle préparation de virus B, souche Lee, purifiée par le méthanol suivie d'une centrifugation différentielle, mise en présence du substrat en solution en tampon phosphate à pH 6,1 a permis de trouver une valeur voisine.

$$K_m = 2,24 \times 10^{-4} \text{ M} \quad (\text{fig. 30})$$

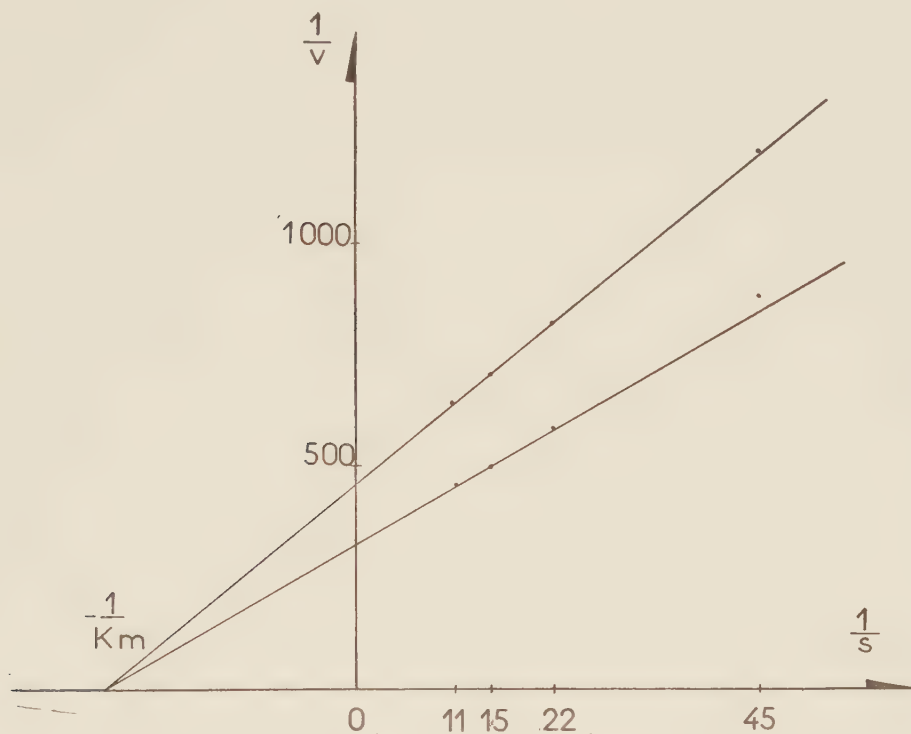


FIG. 30 - Calcul graphique de la constante de Michaelis, 2ème lot de virus B (souche Lee), purifié par précipitation méthanolique suivie de centrifugation différentielle.

$$\frac{I}{K_m} = - 28$$

$$K_m = 357 \mu\text{g pour une prise d'essai de } 2,5 \text{ ml}$$

$$K_m = \frac{357 \times 1000}{2,5} \quad \text{pour un litre en } \mu\text{g}$$

$$K_m = 357 \times 10^{-6} \times 400 = 1420 \times 10^{-4} \text{ en g/litre}$$

$$\text{en M} = \frac{1420 \times 10^{-4}}{633} = 2,24 \cdot 10^{-4} \text{ M.}$$

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN VIRUS.- La figure 3I montre qu'il existe une proportionnalité entre la vitesse initiale d'hydrolyse et la concentration en virus, tant que celle-ci est inférieure, dans nos conditions expérimentales, à 160 unités hémagglutinantes.

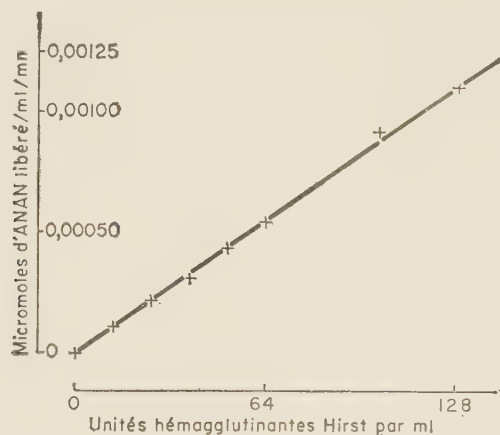


FIG. 3I - Relation entre la vitesse initiale d'hydrolyse de l'ALL et la quantité de virus, au pH optimum de 6,8 en tampon "tris", à 37°C, et pour une concentration de substrat de 0,233 micromole/ml,

en abscisses, les concentrations de virus exprimées en unités Hirst/ml,

en ordonnées, les vitesses initiales d'hydrolyse exprimées en micromoles d'ANAN libéré/ml/mn.

Il devient donc possible de définir une unité conventionnelle d'activité neuraminidasique, comme l'ont déjà fait, pour les virus de type A, Jacobs et Walop (216); on dira qu'une unité d'activité neuraminidasique U est l'activité d'une suspension de virions qui libère par minute une micromole d'acide N-acétylneuraminique à partir de l'acide 3'lactose lactaminique.

INFLUENCE DES PRODUITS DE DEGRADATION SUR LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DE L'ALL .- Nous avons vérifié l'action inhibitrice de l'ANAN (figure 32) qui avait déjà été constatée, en particulier par Walop, Boschman et Jacobs (218) dans le cas de Myxovirus influenzae A₂ . Nous avons également vérifié que le virus préparé par chromatographie sur colonne de phosphate ne possède pas de propriété aldolasique scindant l'ANAN en hexosamine et pyruvate ; on sait en effet qu'une aldolase accompagne la neuraminidase dans les milieux de culture de Vibrio Cholerae (French et Ada (190), Heimer et Meyer (129)).

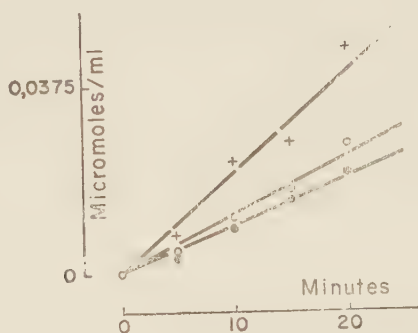


FIG. 32 - Effets inhibiteurs de l'ANAN et du cuivre sur l'activité neuraminidasique du virus. Hydrolyse d'une solution d'ALL (0,150 micromole/ml) par une suspension de virus (256 unités Hirst/ml),

en abscisses, le temps en minutes,

en ordonnées, l'ANAN libéré exprimé en micromoles/ml.

+ ——— + , témoin

o ——— o , en présence de cuivre (SO₄Cu 0,001 M)

° ——— ° , en présence d'ANAN (0,258 micromole/ml).

INFLUENCE INHIBITRICE DU CUIVRE . - Nous avons également noté (figure 32) le fort effet inhibiteur du cuivre à une aussi faible concentration que 0,001 M.

II - CARACTERES DE LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DE L'ACIDE 3'LACTOSE - LACTAMINIQUE PAR MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I (virus SENDAI).

L'action de la suspension virale de Myxovirus parainfluenzae I purifiée par double adsorption-élution sur hématies de veau formolées (voir chapitre troisième) sur le substrat acide 3'lactose-lactaminique préparé précédemment, est suivie dans les mêmes conditions de température et de quantités de produit mises en présence. La recherche de la solution tamponnée et du pH optimum nous ont conduit à choisir le tampon cacodylate de soude-H Cl 0,2 N, à pH 5,6.

Dans ces conditions, la constante de Michaelis a pu être déterminée (figure 33) et a été trouvée égale à $1,05 \times 10^{-3}$ M.

De même qu'avec le virus B (souche Lee), la vitesse initiale d'hémolyse est directement proportionnelle à la concentration du virus (figure 34), en deçà de 640 unités hémagglutinantes Hirst.

III- RECHERCHE DU POUVOIR NEURAMINIDASIQUE EVENTUEL DU LIQUIDE ALLANTOIQUE NON INFECTE. -

On a recherché une activité neuraminidasique éventuelle, dans du liquide allantoïque provenant d'oeufs embryonnés, inoculés au neuvième jour avec 0,2 ml de bouillon ordinaire stérile, et mis en incubation à la température de + 35°C pendant quarante-huit heures. Ce liquide allantoïque est traité soit par la méthode de chromatographie sur colonne de calcium, soit à l'aide de la centrifugation différentielle à 105 000 g pendant deux heures, soit par la méthode que nous avons employée pour Myxovirus parainfluenzae I, c'est-à-dire grâce à l'adsorption sur hématies formolées suivie d'élution.

Dans aucun cas, nous avons observé de libération d'acide acétyl-neuraminique à partir du substrat 3'lactose-lactaminique, confirmant les travaux de Gottschalk et Perry (II9) avec la mucoprotéine purifiée à partir de l'ovomucine.

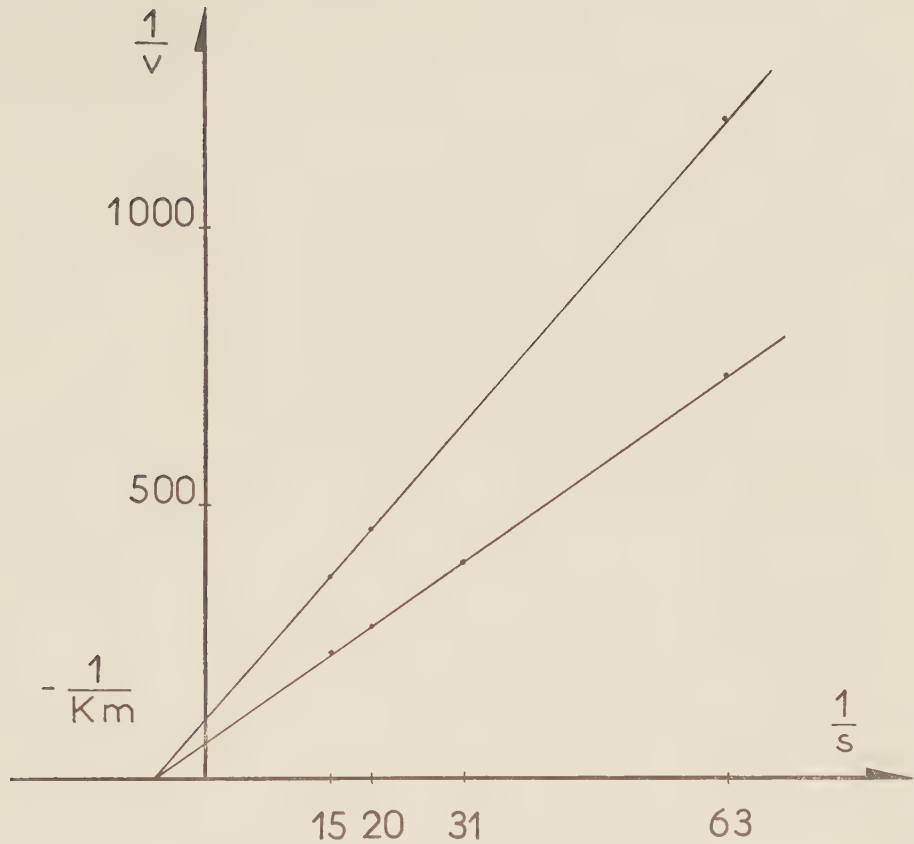


FIG. 33 - Calcul graphique de la constante de Michaelis pour Myxovirus parainfluenzae I.

$$-\frac{1}{K_m} = -6 (\pm 1)$$

$$K_m = 1666 \mu\text{g pour une prise d'essai de } 2,5 \text{ ml}$$

$$K_m = \frac{1666 \times 1000}{2,5} \text{ pour un litre, en } \mu\text{g}$$

$$K_m = 1666 \times 10^{-6} \times 400 = 6664 \times 10^{-4} \text{ g/l}$$

$$= \frac{6664 \times 10^{-4}}{633} = 1,05 \cdot 10^{-3} \text{ M } (0,903 \text{ à } 1,26 \cdot 10^{-3} \text{ M}).$$

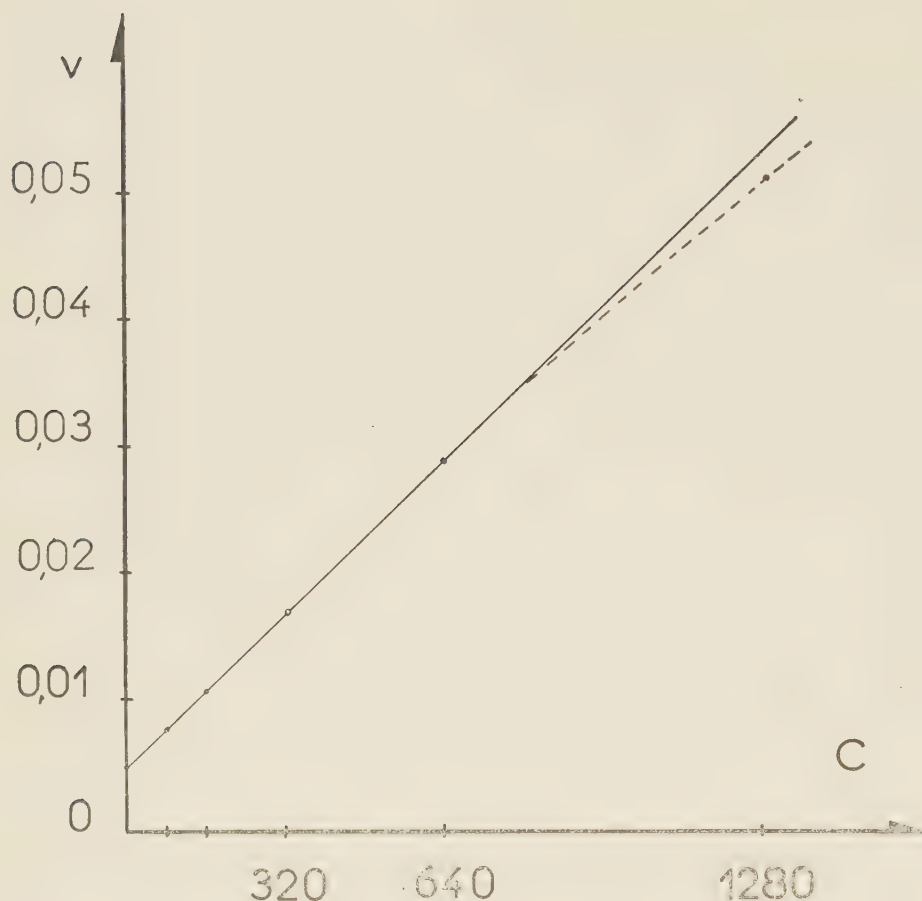


FIG. 34 - Relation entre la vitesse initiale d'hydrolyse v de l'ALL et la concentration du virus Sendai, C , exprimée en unités Hirst, au pH optimum de 5,6 en tampon cacodylate de soude - HCl, à la température de + 37°C et pour une concentration de substrat de 0,240 micromole/ml.

IV - ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE DE MYXOVIRUS INFLUENZAE B SUR LE MUCOPOLYSACCHARIDE DE LA GLANDE SOUS-MAXILLAIRE DE BOEUF.

Myxovirus influenzae B, purifié par chromatographie sur colonne de phosphate de calcium libre, après action sur le mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf, préparé suivant la technique décrite dans notre quatrième chapitre, une subs-

tance qui, après traitement par la méthode de Warren, présente un pic d'absorption à 549 m μ spécifique des acides sialiques (figure 35).

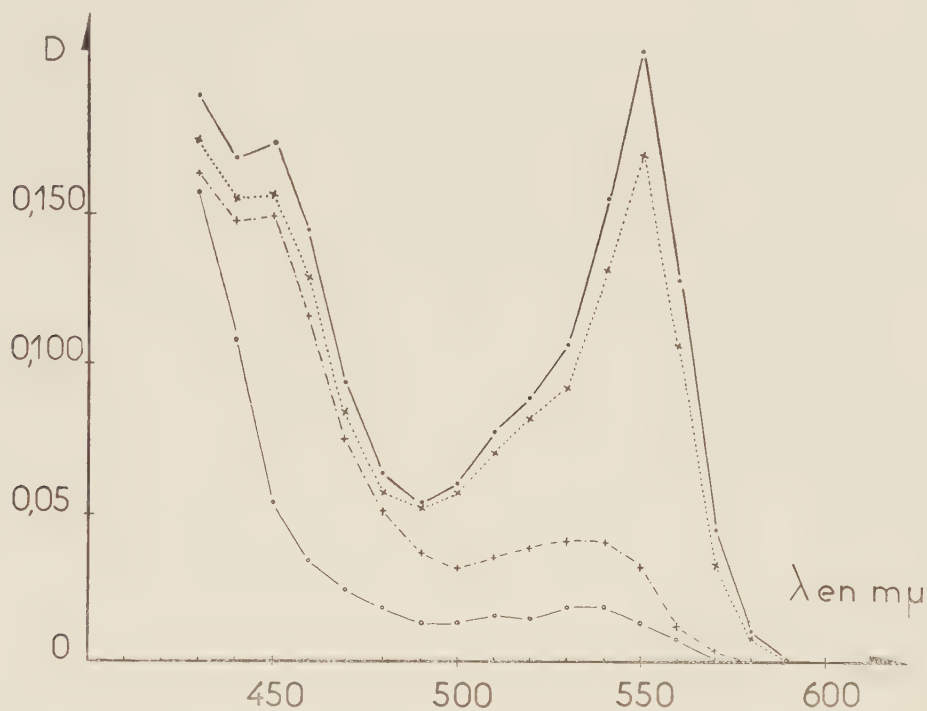


FIG. 35 - Spectrophotométrie de la coloration développée après action de Myxovirus influenzae B sur le substrat mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf (MP), pendant trente minutes à la température de +37°C,

————● 2ml MP en tampon véronal 0,2 M pH 7,4
+ 1ml virus B purifié

x.....x 2ml MP + 0,4 ml tampon
+ 0,6 ml virus B purifié

+ — — + 2ml MP + 1 ml virus B inactivé 45 minutes à +56°C

○————○ 2ml MP + 1 ml tampon véronal.

L'allure générale de la réaction enzymatique en fonction du temps (figure 36) est de type exponentiel. La quantité d'acide sialique, libérée au bout d'un temps donné est donc proportionnelle au logarithme de la concentration en virus, comme l'indique la figure 37. Dans les conditions

où nous nous sommes placés, il est nécessaire d'utiliser une concentration en mucopolysaccharide égale ou supérieure à 0,30 mg/ml pour atteindre la vitesse maximale.

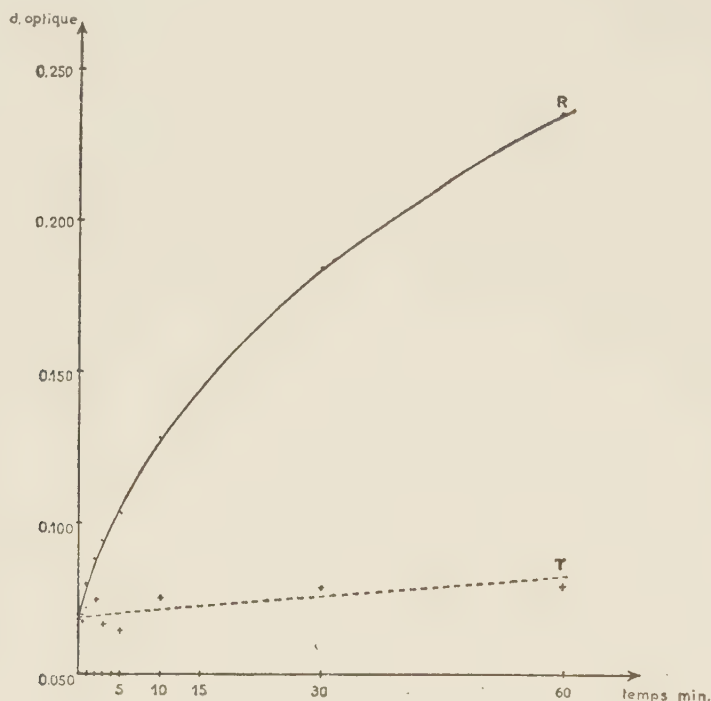


FIG. 36 - Cinétique de l'acide sialique libéré (exprimé par la densité optique à 549 mμ suivant la réaction de Warren) à pH 7,4 à partir du substrat mucopolysaccharidique sous l'action de Myxovirus influenzae B ,

R, cas où à 0,4 ml d'une suspension de virus B titrant 40 000 unités Hirst par ml, on ajoute 1,6 ml de mucopolysaccharide à 0,5 % en tampon véronal 0,2 M pH 7,4

T, mêmes conditions, mais la suspension virale a été préalablement chauffée trente minutes à 56°C (titre hémagglutinant 20 000 unités Hirst).

L'optimum de température est à + 37°C (figure 38).

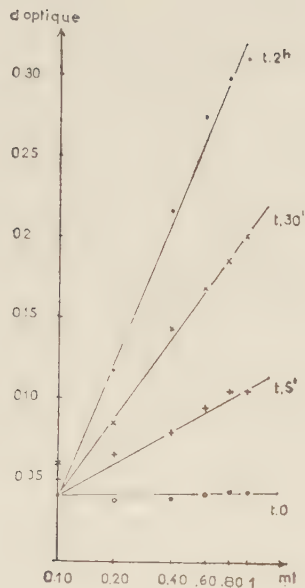


FIG. 37 - Liberation de l'acide sialique en fonction de volumes variables d'une suspension de Myxovirus influenzae B titrant par ml, 10 240 unités Hirst, pour des temps de contact enzyme-substrat variables (coordonnées semi-logarithmiques)

Réaction, à 2 ml d'une solution de mucopolysaccharide à 0,5 p.100 en tampon véronal 0,2 M pH 7,4, on ajoute des quantités variables de suspension virale et la quantité suffisante de solution tamponnée pour ramener le volume à 3 ml.

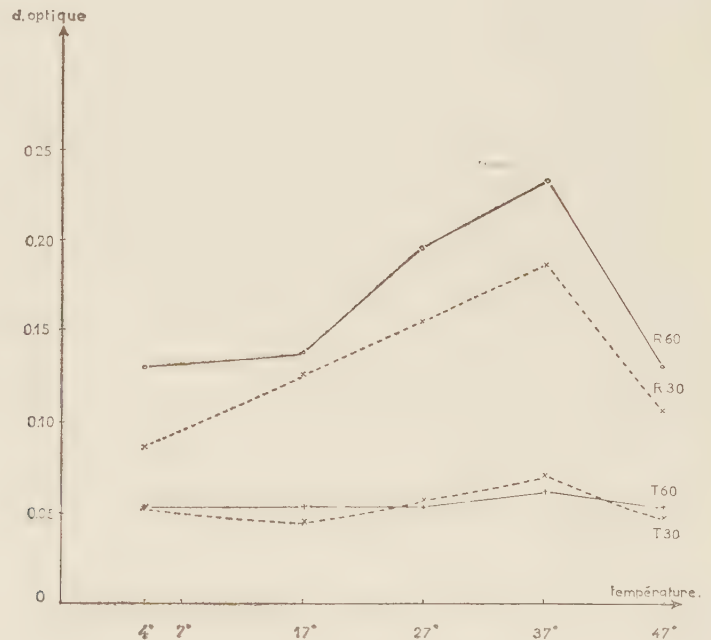


FIG. 38 - Activité neuraminidasique en fonction de la température, pour des temps de contact de trente minutes et de soixante minutes, R, virus B actif; T, virus B inactivé par chauffage trente minutes à 56°C.

V -CINETIQUE DE LIBERATION DE L'ACIDE SIALIQUE A PARTIR DU MUCOPOLYSACCHARIDE DE LA GLANDE SOUS-MAXILLAIRE DE BOEUF PAR MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I.-

De multiples essais, dans des conditions expérimentales très variables démontrent que dans ce cas, la libération de l'acide sialique se fait suivant une cinétique incohérente. Tout se passe comme si l'addition du virus purifié par centrifugation différentielle provoquait une libération immédiate et brutale d'acide sialique, mais aussi comme si cette libération était aussitôt bloquée. Quand on répète les dosages, en fonction du temps on constate des variations, apparemment distribuées au hasard, de la concentration en acide sialique (figure 39); or ces variations ne peuvent être imputées à la technique du dosage, comme le prouvent les résultats que nous venons de décrire, obtenus dans le cas de Myxovirus influenzae B ou dans le cas de l'emploi de l'acide 3'lactose-lactaminique comme substrat avec Myxovirus parainfluenzae I lui-même. De fait, l'amélioration de la précision des pipetages, en particulier par l'usage des micropipettes automatiques, n'a aucunement amélioré les résultats. De même, on a éliminé les causes d'erreur éventuelles dues à une mauvaise dispersion du virus, en opérant en milieu agité. La constance de la température a été contrôlée au 1/100 ème de degré près.

On a éliminé l'hypothèse d'une adsorption partielle de l'acide sialique sur les parois du récipient, et également l'hypothèse d'une destruction enzymatique ou par la lumière, de l'acide sialique libéré. Il faut admettre que l'incohérence apparente de la libération de l'acide sialique à partir du mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf, par Myxovirus parainfluenzae I n'est pas un artefact, mais bien l'expression d'une particularité propre à ce virus.

VI - ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE DES SOUCHES A, A₁, A₂, DE MYXOVIRUS INFLUENZAE SUR LE MUCOPOLYSACCHARIDE DE LA GLANDE SOUS-MAXILLAIRE DE BOEUF.-

La figure 40 montre que Myxovirus influenzae A₂ présente une cinétique cohérente de libération d'acide sialique analogue à celle observée avec

Myxovirus influenzae B; mais qu'il en est nullement de même avec Myxovirus influenzae A et A_I. Myxovirus influenzae A, souche PR₈ paraît totalement dénué d'activité. Myxovirus influenzae FM_I témoigne bien d'une activité neuraminidasique, mais d'un type analogue à celui de Myxovirus parainfluenzae I.

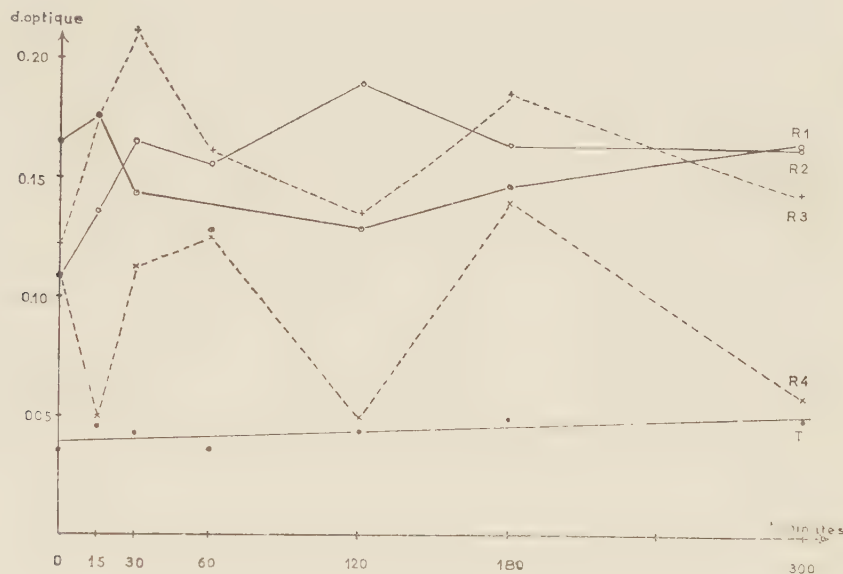


FIG. 39 - Libération d'acide sialique en fonction du temps sous l'action de Myxovirus influenzae I,
R₁, 4 ml de substrat à 0,5 p.100 + 1 ml d'une suspension de virus purifié par précipitation méthanolique, titrant 5120 unités Hirst par millilitre,
R₂, mêmes conditions, mais le virus a été purifié par centrifugation différentielle (5120 unités/ml),
R₃ , conditions de R₂, mais le volume de virus est de 0,50 ml
T, témoin où le virus a été préalablement inactivé par chauffage trente minutes à 56° C.

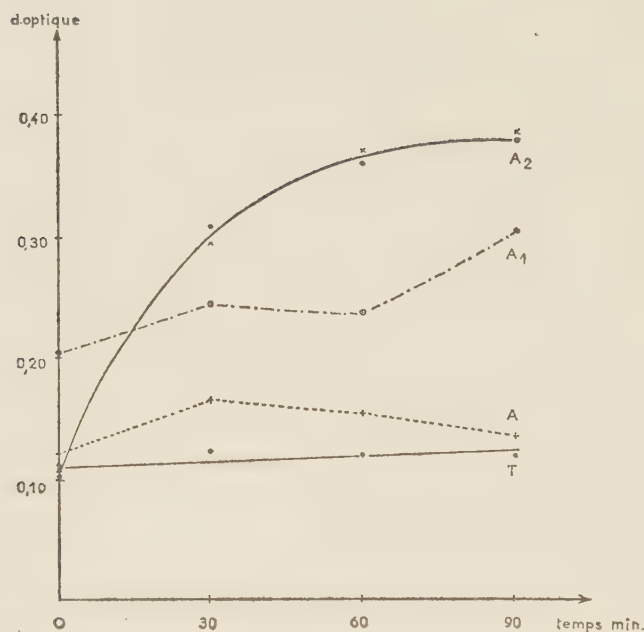


FIG. 40 - Activité neuraminidasique des souches A (PR8), A_I (FM_I), A₂ (Asia) de Myxovirus influenzae, T, témoin où le virus A₂ a été inactivé par chauffage préalable pendant trente minutes à la température de + 56° C.

DISCUSSION

Alors que les cinétiques de l'activité neuraminidasique de Myxovirus influenzae B, souche Lee et de Myxovirus parainfluenzae I sur l'acide 3' lactose-lactaminique pris comme substrat sont d'ordre zéro, il en est tout différemment quand le substrat est le mucopolysaccharide extrait de la glande sous-maxillaire de boeuf. Dans le cas de M. influenzae de type A₂ (souche Asia) et de type B (souche Lee), la vitesse de réaction se ralentit progressivement, témoignant de l'interférence d'un inhibiteur de l'activité enzymatique. Il peut paraître logique de penser que cet inhibiteur est un des produits de dégradation du substrat. De fait, on a montré

que l'acide sialique libre est un inhibiteur compétitif de l'enzyme, mais l'intensité de l'effet constaté dans le cas de l'emploi du mucopolysaccharide comme substrat est beaucoup trop marquée pour lui être rapportée. Il faudrait admettre que l'inhibition est due au copule résiduel après libération de l'acide sialique à moins qu'elle ne soit due au mucopolysaccharide intact.

La constatation lors de l'emploi de préparations différentes de virus, de l'absence de parallélisme entre l'activité hémagglutinante et l'activité neuraminidasique est particulièrement intéressante car elle implique l'existence d'au moins deux catégories de sites à la surface de la particule virale, l'une responsable d'une hémagglutination indépendante de l'activité enzymatique, l'autre responsable de l'activité enzymatique. Dans ce dernier cas, l'adsorption du mucopolysaccharide à la surface du virus est réversible, le site actif se trouvant libéré lorsque l'hydrolyse du substrat adsorbé est réalisé; dans l'autre cas au contraire, il n'y a aucune raison pour qu'il en soit ainsi et l'adsorption du mucopolysaccharide sur les sites responsables de l'hémagglutination est vraisemblablement irréversible. Cette conception de l'existence de deux types de sites actifs à la surface des particules virales, l'un correspondant à l'activité hémagglutinante, l'autre correspondant à l'activité neuraminidasique, se trouve en fait définitivement établie depuis que l'on a pu isoler chimiquement les substances virales responsables de ces deux activités et montrer qu'elles étaient distinctes (Mayron, Robert, Winzler et Rafelson (219)).

Les caractères cinétiques de l'hydrolyse de l'acide 3'lactose lactaminique pur, par les virions purifiés de la souche Lee de Myxovirus influenzae de type B et de Myxovirus parainfluenzae I (virus Sendai) ont permis de calculer la constante de Michaelis. Dans le cas du virus B, elle est égale à $2,75 \times 10^{-4}$ M pour le virus purifié par chromatographie sur phosphate de calcium et à $2,24 \times 10^{-4}$ M pour le

virus purifié par précipitation par le méthanol, valeur voisine de celle trouvée par Noll, Aoyagi et Orlando (194). Le calcul de la constante de Michaelis pour le virus Sendai conduit à une valeur bien plus forte puisque nous avons trouvé $1,05 \times 10^{-3}$ M.

Ces valeurs de K_m sont nettement distinctes de celle trouvée par Walop, Boschman et Jacobs (218), dans le cas du virus A₂ de la grippe où elle est égale à 6×10^{-4} M.

Dans la mesure où la constante de Michaelis permet d'évaluer l'affinité d'un enzyme pour son substrat, l'affinité du virus du type B chez Myxovirus influenzae est plus faible vis-à-vis de l'acide 3'lactose-lactaminique que celle du virus de type A, elle même plus faible que celle de Myxovirus parainfluenzae I.

Ces caractères cinétiques ont permis de définir une unité enzymatique. Par convention, c'est l'unité d'activité d'une suspension de virions qui libère par minute une micromole d'acide N-acétyl-neuraminique à partir de l'acide 3'lactose-lactaminique.

* *
*

On pourra donc titrer le virus par mesure de cette activité neuraminidasique à la température de + 37°C, dans les conditions où la cinétique d'hydrolyse est d'ordre zéro.

Du point de vue pratique, l'hydrolyse enzymatique est réalisée par addition de 0,25 ml d'échantillon à 250 µg de substrat dissous dans 1 ml de tampon (cacodylate de soude- H Cl 0,2 N, à pH 5,6 pour Myxovirus parainfluenzae I; phosphate monosodique- disodique 0,2 M, à pH 6,8 pour Myxovirus influenzae B). La vitesse initiale est déterminée par dosage de l'acide lactaminique libéré, à l'aide de la méthode colorimétrique de Warren (65) aux temps de 30 secondes, 2, 4, 6 et 10 minutes.

CHAPITRE SIXIEME

METHODE PHOTOMETRIQUE

DE TITRAGE

DU POUVOIR HEMAGGLUTINANT

DES MYXOVIRUS

La recherche d'une relation exacte entre le pouvoir infectieux et le pouvoir hémagglutinant conduisit Levine, Puck et Sagik (220) à tenter de mettre au point une méthode de mesure de l'hémagglutination à l'aide d'une étude spectrophotométrique à 490 m μ de la sédimentation d'un mélange constitué par des hématies et du virus grippal, mais ils ne s'étaient pas préoccupés de la température ce qui leur interdit toute relation quantitative.

Horsfall (221), à la même époque et à l'aide d'une méthode voisine remarqua que la sédimentation était linéaire pour des faibles quantités de virus, mais seulement dans l'intervalle de temps compris entre 90 et 140 minutes.

La méthode photométrique de Drescher (222, 223), puis de Drescher Hennessy et Davenport (224), reprise par Schmidt (225), qui s'appuie sur une analyse expérimentale extrêmement fouillée, a le défaut d'être complexe à mettre en oeuvre, notamment à cause de la nécessité d'un étalonnage préalable à chaque essai.

Schreier (226) appliqua cette méthode à la mise en évidence d'anticorps, tandis que Tischer (227) montra que la séquence obtenue en clas-

sant les myxovirus d'après le pH qui provoquait une sédimentation minimale, était identique à celle des gradients de récepteur.

Les différentes méthodes de titrage du pouvoir hémagglutinant proposées jusqu'ici, ne possédant pas les qualités de précision et de fidélité nécessaires à une étude approfondie de la structure virale, nous avons porté notre attention sur la cinétique de la sédimentation en cherchant à en déterminer les constantes, ce qui a permis d'obtenir une bonne précision et de simplifier considérablement le titrage (Colobert, Duffrène et Fontanges (228).

I - MYXOVIRUS INFLUENZAE , type B

A - PRINCIPE ET DISPOSITIF EXPERIMENTAL .- Le dispositif expérimental est constitué par un photomètre Meunier* qui présente l'avantage de permettre une circulation d'eau autour de la cuve photométrique et par ce moyen, de contrôler avec précision, ce qui est indispensable, la température dans celle-ci. Les cuves utilisées ont une section carrée de 1 cm de côté, et la longueur d'onde choisie est de 590 mμ. Le culot d'hématies, d'origine humaine, groupe O Rh + est employé à la dilution au 1/1000 ème (v/v) dans une solution à 9 g p. 1000 de chlorure de sodium.

A 3 ml de cette suspension, on ajoute 1 ml de la suspension de l'agent hémagglutinant (virus ou hémagglutinine) préparé et purifié suivant les techniques exposées dans notre troisième chapitre, après équilibrage préalable des températures des deux réactifs. La lecture nécessite au départ l'utilisation de la première surcharge livrée avec l'appareil; on l'écarte en cours d'observation.

B - ALLURE GENERALE DE LA CINETIQUE DE SEDIMENTATION.- L'expérience montre que, dans ces conditions, la variation de la densité optique

* électrophotomètre Meunier, Jobin et Yvon, Arcueil (Seine).

d'une suspension d'hématies, en l'absence d'hémagglutination est directement proportionnelle au temps, pendant le début de l'expérimentation.

Ce résultat doit être attribué au dispositif expérimental lui-même et, en particulier, à la position du faisceau lumineux sur la partie médiane de la cuve de sédimentation.

En réalité, si on suit le phénomène pendant des temps assez longs, on obtient une cinétique de type exponentiel répondant à la loi de Beer-Lambert,

$$d = d_0 \exp. (- kt)$$

En présence du virus global B ou de son agglutinine, cette cinétique n'est pas modifiée et, après une période d'induction, d'autant plus faible que la concentration est plus forte et qui pourrait être due au temps nécessaire pour les particules virales à rencontrer suffisamment d'hématies pour produire les agrégats, la pente à l'origine de la courbe représentative de la sédimentation en fonction du temps est simplement augmentée et d'autant plus, que la concentration en agent hémagglutinant est plus grande (figure 4I).

La figure 4I montre de plus, que dans le cas du virus B, au bout d'un temps suffisant, la valeur limite étant atteinte, la courbe peut être assimilée à une droite parallèle à celle du témoin sans virus. L'examen au microscope, des hématies en train de sédimenter, par bascule de la platine dans un plan vertical et observation optique horizontale, montre la formation d'agglutinats qui tombent plus vite que les hématies libres. Quand la pente redevient celle du témoin, il n'y a plus d'agglutinats en suspension seules les hématies demeurées libres sédimenter encore.

La loi de Beer-Lambert peut s'écrire, en première approximation,

$$d = d_0 \cdot (1 - kt) \quad \text{avec} \quad k = - \frac{p}{d_0}$$

si d_0 représente la densité optique de départ et p , la pente de la droite dans des coordonnées semi-logarithmiques.

A la température de 23,5°C et dans le cas d'une suspension d'hématies au 1/1000 (v/v), on obtient les valeurs suivantes de k, en fonction de la concentration en virus grippal B, souche Lee (tableau XVI).

Concentration virale	$k \times 10^{-3} \text{ mn}^{-1}$
0	1,50
5/1000	1,80
1/100	2,26
2/100	2,89
3/100	2,55
5/100	3,24
10/100	2,58
25/100	3,09

Tableau XVI - Valeurs de k pour différentes concentrations de virus grippal B.

Dans le cas de l'hémagglutinine extraite du virus B, pour une même température de 23,5°C, mais avec une suspension d'hématies au 1/2000 (v/v), on obtient les valeurs suivantes de k (tableau XVII).

Concentration en hémagglutinine	$k \times 10^{-3} \text{ mn}^{-1}$
1/1000	1,96
5/1000	2,70
1/100	3,14
3/100	4,13
5/100	3,86
10/100	3,65

Tableau XVII - Valeurs de k pour différentes concentrations d'hémagglutinine extraite de Myxovirus influenzae B.

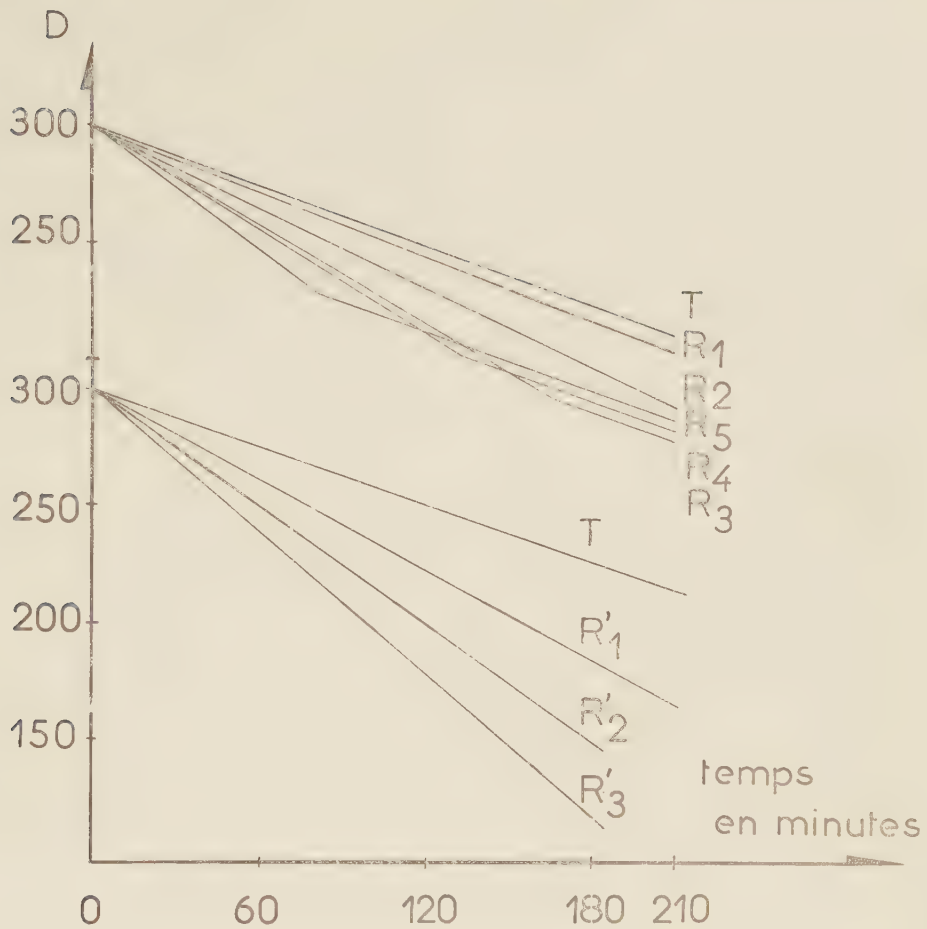


FIG. 41 - Variations de la densité optique D (exprimée en unités conventionnelles, chaque unité étant égale à la densité optique 0,0031) en fonction du temps et de concentrations diverses de facteur hémagglutinant (Myxovirus influenzae B),

T, sédimentation témoin,

R, virus; les indices 1 à 5 désignent les concentrations relatives de virus : 1, 10, 20, 30 et 100,

R', hémagglutinine ; les indices 1 à 3 désignent les concentrations relatives de 5, 10 et 50.

Si on porte ces valeurs de k en fonction de la concentration en facteur hémagglutinant, on obtient, pour les dilutions supérieures à 5/100, des courbes de type exponentiel qui se transforment en droite en portant en abscisses le logarithme de la concentration virale et en ordonnées, les valeurs de k . Dans des conditions définies de température et de concentration en hématies, il suffira donc d'établir le rapport p/d_0 expérimentalement, pour en déduire la concentration en facteur hémagglutinant, puisque la relation qui lie ces deux facteurs est linéaire :

$$\alpha \log q_0 = k$$

si q_0 représente la concentration virale.

C - INTERPRETATION THEORIQUE. - On peut, par le calcul, prévoir quelle serait la variation de la densité optique en fonction du temps, dans l'hypothèse la plus simple, à savoir qu'à chaque instant, la quantité d'hématies qui sort du faisceau lumineux du photomètre est proportionnelle au nombre d'hématies contenu dans ce faisceau, c'est-à-dire à la concentration en hématies C , (Colobert et Fontanges (229)),

$$- \frac{dC}{dt} = k_I C \quad (1)$$

$$\text{ou } k_I t = 2,303 \log \frac{C_0}{C} \quad (2)$$

C_0 étant la concentration initiale.

Comme l'expérience montre que, pour une même épaisseur traversée, la densité optique D est proportionnelle à la concentration d'une suspension d'hématies, on peut écrire,

$$k_I t = 2,303 \log \frac{D_0}{D} \quad (3)$$

D désignant la densité optique de la suspension au temps t , D_0 la densité

optique à l'instant $t = 0$.

Cette équation, tout à fait générale, deviendra en présence de facteur hémagglutinant,

$$k_I t = 2,303 \log \frac{D_o}{D_a} \quad (4)$$

si D_a représente la densité optique mesurée au temps t et, en l'absence de virus,

$$k'_I t = 2,303 \log \frac{D_o}{D_T} \quad (5)$$

D_T désignant la densité optique mesurée au temps t avec la suspension témoin d'hématies, sans facteur hémagglutinant.

Dans l'équation (4), la quantité de virus q qui se trouve située dans la zone d'observation photométrique est constamment proportionnelle à C donc à D si l'on se trouve dans des conditions telles que la totalité du facteur hémagglutinant est adsorbée sur les hématies et que la répartition est statistiquement homogène.

On a donc :

$$D = k_2 \cdot q$$

$$D_o = k_2 \cdot q_o, \text{ à l'instant } t = 0 \quad (6)$$

Remplaçons D_o par sa valeur (6) dans (5)

$$k'_I t = 2,303 \log \frac{k_2 q_o}{D_T} \quad (7)$$

En faisant le rapport de (4) et (7) on a :

$$k \cdot \log \frac{D_o}{D_a} = \log \frac{k_2 q_o}{D_T} \quad (8)$$

$$k \cdot \log \frac{D_o}{D_a} = \log k_2 q_o - \log D_T \quad (9)$$

$$\log q_o = k \cdot \log D_o + \frac{D_T}{D_a} - \log k_2 \quad (10)$$

nous retrouvons l'équation linéaire entre le logarithme de la concentration en facteur hémagglutinant et les densités optiques D_T et D_a prises au bout du même temps au cours de la sédimentation, respectivement en l'absence et en présence du facteur hémagglutinant, puisque k_2 est une constante.

D - RELATION ENTRE LA VITESSE RELATIVE DE SÉDIMENTATION ET LA CONCENTRATION EN FACTEUR D'HEMAGGLUTINATION.

La figure 42 montre que cette relation est d'allure exponentielle. La vitesse relative de sédimentation tendant vers une limite, la sensibilité et la précision d'une méthode de titrage fondée sur elle diminuera rapidement quand la concentration en facteur hémagglutinant augmente.

E - RECHERCHE D'UNE UNITE CONVENTIONNELLE D'HEMAGGLUTINATION.

Par convention, posons $q_o = 1$ lorsque $D_o = 1$ (exprimé en densité optique) dans le cas d'une cuve de 1 cm d'épaisseur, et $\log k_2 = 1$. En remplaçant dans (10) on obtient ;

$$\log \frac{D_T}{D_a} = 1$$

$$\text{d'où} \quad \frac{D_T}{D_a} = 10$$

Comme l'unité q_o ainsi définie est beaucoup trop grande pour être commode, on utilisera le sous-multiple u tel que $q_o = 1000 u$. Ainsi par convention, on dira que 1000 unités hémagglutinantes représentent la quantité de virus ou d'hémagglutinine qui, contenue sous un volume de 4 ml d'une suspension d'hématies humaines O Rh+, de densité optique égale à 1, dans

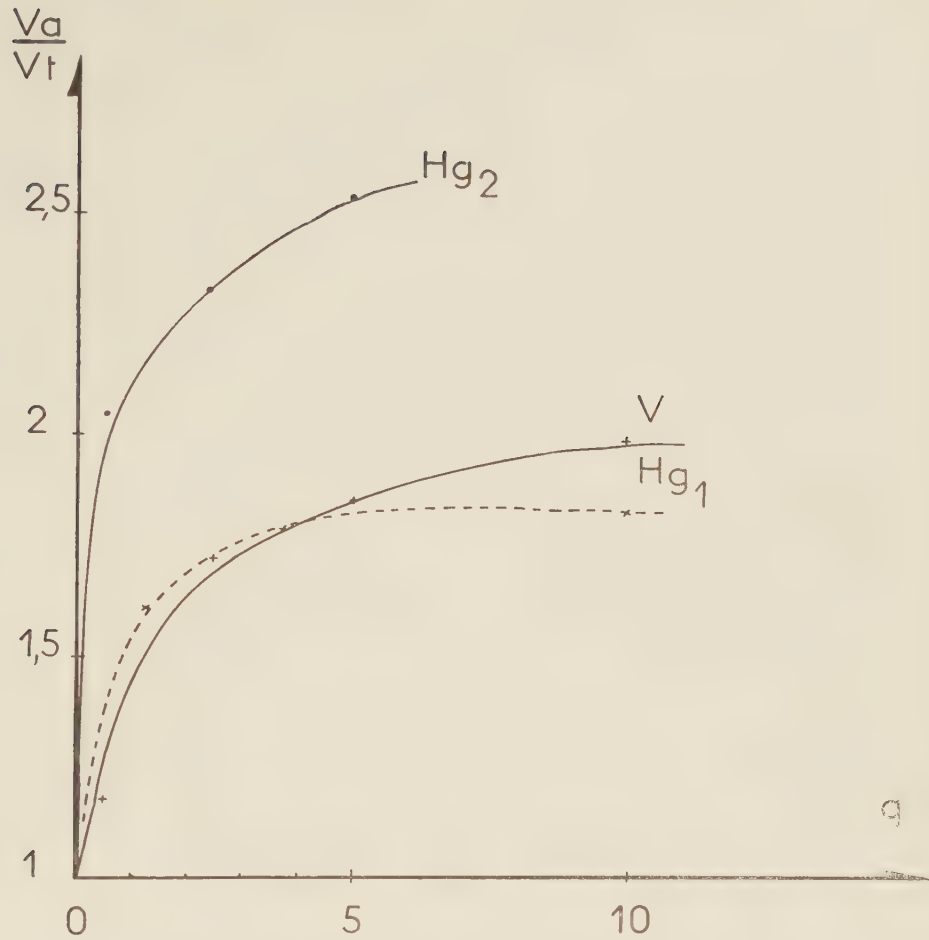


FIG. 42 - Variation de la vitesse relative de sédimentation V_a/V_t en fonction de la quantité q , en facteur hémagglutinant,

Hg , hémagglutinine (Hg_I et Hg_2 pour des suspensions d'hématies de densités optiques respectives, égales à 0,75 et 1),

V , virus, pour une densité optique d'une suspension d'hématies égale à 1.

une cuve de 1 cm d'épaisseur, provoque, dans les conditions standard d'observation, une sédimentation telle que la densité optique mesurée au bout d'un temps t soit le I/I_0 de celle de la suspension sédimentant en l'absence de facteur hémagglutinant.

L'équation générale (I0) devient égale à :

$$\log q_0 \times I_0^3 = k \cdot \log D_0 + \frac{D_T}{D_0} - I \quad (II)$$

ou q_0 est exprimé en unités U, si D_0 est exprimé en densité optique.

F - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE. - La vitesse de sédimentation est extrêmement sensible à la température qu'il est indispensable de contrôler au I/I_0 ème de degré près. La vitesse de sédimentation est d'autant plus lente que la température est plus basse et, à $0,6^\circ\text{C}$, elle est pratiquement nulle. Dans le cas des températures voisines de 0°C , notre dispositif comprend une enceinte fermée remplie de silicagel pour éviter la condensation de la vapeur d'eau atmosphérique sur les surfaces traversées par le faisceau.

On a cherché à déterminer le mécanisme de l'influence de la température. On sait que la vitesse de sédimentation V , sous l'influence d'un champ d'accélération g , est donnée, pour une particule sphérique, par la formule classique dérivée de celle de Stokes :

$$9 \eta V = 2g \cdot r^2 (d_2 - d_1)$$

où r est le rayon de la particule, d_2 sa masse spécifique, d_1 celle du fluide et η la viscosité du milieu. La considération des valeurs relatives des vitesses de sédimentation permet d'écarter les facteurs liés à la nature de la particule et notamment à sa forme, en négligeant la variation de la masse spécifique de l'eau avec la température,

$$\frac{V_I}{V_2} = \frac{\eta_2}{\eta_I}$$

Si on remarque que les vitesses à l'origine, V_I et V_2 sont respectivement proportionnelles aux pentes α_I et α_2 des droites de sédimentation correspondant à deux températures différentes θ_I et θ_2 on a :

$$\frac{\alpha_I}{\alpha_2} = \frac{\eta_2}{\eta_I}$$

Le tableau XVIII montre que cette relation est vérifiée par l'expérience. Le rapport des viscosités, calculé d'après les tables donnant la viscosité de l'eau distillée en fonction de la température, a pu être contrôlé au microviscosimètre (voir quatrième chapitre) avec un écart inférieur ou égal à 2%.

Il apparaît donc que l'augmentation de la viscosité du milieu, consécutif à l'abaissement de la température suffit à expliquer la diminution parallèle de la vitesse de sédimentation.

$\theta^\circ\text{C}$	8	16	17	23	24	27	37
$\frac{\alpha_{20^\circ}}{\alpha_\theta}$	1,44	1,08	1,05	0,97	0,92	0,90	0,70
$\frac{\eta_0}{\eta_{20^\circ}}$	1,38	1,11	1,08	0,93	0,91	0,90	0,70

Tableau XVIII - Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques en fonction de la température,

$\theta^\circ\text{C}$, température d'expérience,

$\frac{\alpha_{20^\circ}}{\alpha_0}$, rapport des pentes à l'origine des courbes expérimentales de sédimentation aux températures 0 et 20°C,

$\frac{\eta_0}{\eta_{20^\circ}}$, rapport des viscosités de l'eau distillée * calculé d'après les tables aux températures 0 et 20°C.

La sensibilité d'une méthode de titrage fondée sur la détermination de la vitesse de sédimentation se trouvera donc d'autant plus grande que l'on opère à une température plus élevée. Pratiquement, il semble convenable de la fixer entre + 20°C et + 37°C.

II - MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I (virus SENDAI).

Les difficultés d'adapter cette méthode photométrique (Colobert et Fontanges (230)), à Myxovirus parainfluenzae I proviennent du caractère hémolytique de ce dernier. On voit, sur la figure 43, que lorsqu'on utilise des hématies fraîches, la variation de la densité optique n'est nullement linéaire comme dans le cas du virus du type B, souche Lee, mais présente une forme en S, avec un point d'inflexion. Cette particularité tient manifestement à la lyse d'un certain nombre d'hématies engagées dans les agglutinats, lyse visible à l'observation microscopique.

Pour tourner cette difficulté, on a utilisé les hématies formolées selon le procédé de Cox et Pirtle(92), ou traitées par la méthode voisine de Fauconnier (231, 232) qui laisse en contact les hématies avec le formol en solution isotonique pendant six heures au bain-marie à la température de + 37°C. Grâce à cet artifice, on observe des courbes linéaires de sé-

* Dans nos expériences, le solvant est une solution de chlorure de sodium à 9 g p. 1000 mais sa viscosité ne diffère que de quelques centièmes de centipoise par rapport à la viscosité de l'eau distillée à la même température.

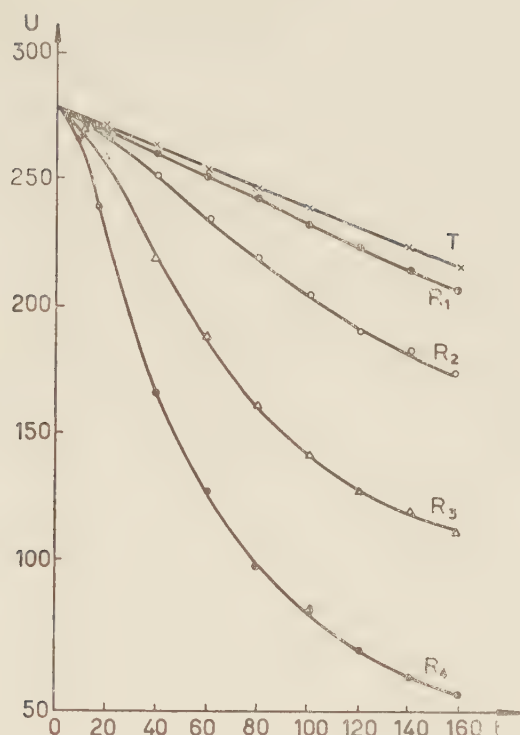


FIG. 43 - Variation de la densité optique (exprimée en unités conventionnelles, chaque unité étant égale à la densité optique 0,0031), en fonction du temps t (exprimé en minutes) pour une suspension d'hématies non formolées, en présence de concentrations diverses de Myxovirus parainfluenzae I,

R₁, R₂, R₃, R₄; 6,4 ; 19,2 ; 32 et 64 unités hémagglutinantes Hirst,

T ; témoin sans virus.

direction(fig. 44) et l'équation précédemment établie se trouvant vérifiée, la définition que nous avons proposée pour l'unité d'activité hémagglutinante peut être conservée.

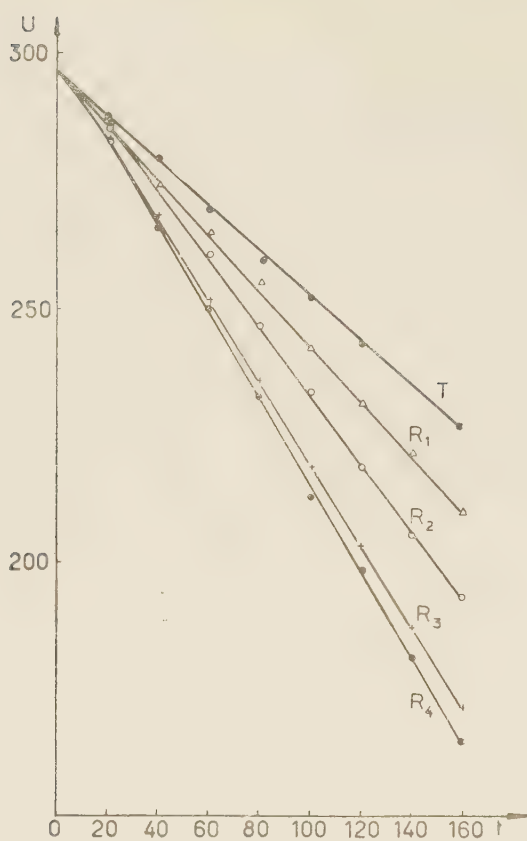


FIG. 44 - Variation de la densité optique (exprimée en unités conventionnelles, chaque unité étant égale à la densité optique 0,0031) d'une suspension d'hématies formolées, en fonction du temps t, pour des concentrations diverses de Myxovirus parainfluenzae I,

R₁, R₂, R₃, R₄ ; 6,4 ; 19,2 ; 32 et 64 unités hémagglutinantes Hirst,

T, témoin sans virus.

Ces résultats sont identiques avec des lots d'hématies formolées lyophilisées, de conservation facile en ampoules.

La lyophilisation doit être effectuée avec un soin particulier pour éviter les phénomènes de surfusion au moment de la transformation de l'état solide congelé à l'état sec deshydraté, phénomènes qui conduisent à la formation d'agglutinats non spécifiques.

L'activité hémagglutinante de Myxovirus Influenzae type B, souche Lee, peut être titrée avec précision par la détermination de la vitesse de sédimentation des agglutinats d'hématies. Cette méthode est applicable à Myxovirus parainfluenzae I, mais le caractère hémolytique de ce virus nécessite l'emploi d'hématies formolées. La vitesse de sédimentation est fonction de la température et ce phénomène peut être rattaché aux modifications de viscosité du milieu.

CHAPITRE SEPTIEME

METHODE DE TITRAGE

DU POUVOIR HEMOLYTIQUE DE

MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I

I- L'HEMOLYSE VIRALE.

C'est en 1948 que Morgan, Enders et Wagley (233) découvrirent une nouvelle propriété du virus varicelien, celle d'hémolyser une suspension d'hématies, à la température de + 37° C, dans un milieu tamponné à pH 7,2. Cette propriété, qui distinguait ce virus parmi des virus voisins, fut retrouvée par Kilham (234) l'année suivante puis par Burnet (235, 236), dans le cas du virus de la maladie de Newcastle.

Le caractère hémolytique de Myxovirus parainfluenzae I, objet de nos recherches depuis 1958, fut découvert par Fukai et Suzuki (237) en 1951 sur une souche isolée à partir de la souris de laboratoire, et par Sato et Yukino (238), Yoshida (239) en 1958, sur une souche provenant d'un cas de pneumonie du nouveau-né.

Ce phénomène d'hémolyse fut encore retrouvé par Mussgay et Lederhiller (240), Karabatsos (241) avec le virus de l'encéphalite équine américaine de l'Est et de l'Ouest, mais uniquement après congélation de la suspension virale.

Enfin, tout récemment, Hermodsson, Dinter et Bakos (242) mettaient en évidence une souche bovine hémolytique de parainfluenzae 3 tandis que

Norrby et Falksveden (243) étudiaient cette propriété sur le virus de la rougeole cultivé sur cellules souches.

Ces découvertes posèrent le problème de la nature de la substance responsable et de ses rapports avec la structure virale. Nous avons abordé ce problème, mais avant d'essayer de dissocier la particule virale et de suivre, au cours des différentes dégradations, le devenir ou la disparition du pouvoir hémolytique, il était nécessaire d'étudier complètement le phénomène de la lyse des hématies et de mettre au point une méthode de titrage.

Pour Kilham (234) Mac Collum et Brandly (244) cette méthode consistait à mettre en présence pendant 12 h à + 37°C le virus de la maladie de Newcastle et une suspension d'hématies pour pouvoir ensuite apprécier à l'oeil nu, le degré d'hémolyse d'après l'échelle employée habituellement pour les épreuves sérologiques. Ainsi, une hémolyse voisine de 75 % était indiquée par " 4 + " tandis que des traces d'hémolyse étaient représentées par " I + ". Atanasiu, Edipides et Basset (245) ont ramené le temps d'incubation à 3 h, exprimant le degré d'hémolyse en pourcentage de l'hémolyse totale, après lecture du surnageant de centrifugation au photomètre, à la longueur d'onde de 550 mμ.

Kahnke (246) en 1951 montra que ce pourcentage d'hémolyse pouvait varier avec la nature des hématies et qu'il était possible d'établir une droite sur papier semi-logarithmique en fonction de la concentration virale, mais ce n'est qu'en 1954 que Granoff et Henlé (247, 248) entreprirent l'étude générale des cinétiques, sans pour autant définir une unité hémolytique.

Les conditions optimales de titrage furent établies par Sagik et Levine (249) lorsqu'ils mirent en évidence l'inhibition de l'hémolyse aux basses températures, et aux pH extrêmes de 4 et de 10,5.

Ce phénomène permit encore à Macpherson et Swain (250) de décrire deux types de virus de la maladie de Newcastle, d'après l'intensité de l'hé-

molyse obtenue, après addition de 10 ml de liquide allantoïque infecté, à 0,25 ml de culot d'hématies humaines O Rh+, tandis que Neurath (251) mettait au point une technique de dosage des anticorps d'après leur degré d'action inhibitrice sur un lot de virus hémolytique.

C'est en 1958 que Hosaka (252) étudia les cinétiques d'hémolyse du liquide allantoïque infecté par Myxovirus parainfluenzae I, avant et après une série de congélations suivies de décongélations. A la même époque, nous mettions au point, pour ce même virus, une méthode de titrage (Colobert et Fontanges (230)), ne nécessitant que l'observation des premières minutes du phénomène et permettant de définir une unité hémolytique.

L'étude cinétique que nous avons ainsi entreprise fut reprise par Neurath et Sokol en 1961 (253) puis en 1962 (254), qui mesurèrent la quantité d'hémoglobine libérée à la température de + 37°C, à l'aide de la méthode de Zijlstra et Van Kempen (255) au réactif au ferricyanure de potassium. Ils établirent qu'il existait une relation linéaire entre la concentration virale, C, et le pourcentage d'hémolyse, H%,

$$\frac{C}{H \%} = a. C + b. S$$

et

$$\frac{C}{S} = A. \frac{C}{S} + B$$

où S est la concentration totale en hémoglobine et s la concentration en hémoglobine libérée par le virus après 2 h d'incubation à la température de + 37°C, les autres termes désignant des constantes.

Enfin, Ho (256), lors d'une étude d'inhibition spécifique d'hémolyse chez Myxovirus parainfluenzae I est revenu au pourcentage d'hémolyse comme méthode de titrage.

Pour essayer de connaître la nature exacte du phénomène et pour

tenter de définir une unité conventionnelle, il nous semblait important d'entreprendre une étude systématique en fonction de différents paramètres (Chabert, Fontanges et Colobert (257)), pour pouvoir comparer les cinétiques d'hémolyse obtenues par le virus, d'une part, à celles établies avec des substances chimiques telles que la lysolécithine, d'autre part, à celles obtenues avec les hémolysines bactériennes, comparaison qui fera l'objet de notre chapitre suivant.

La cinétique de l'hémolyse provoquée par la lysolécithine est en effet caractéristique, comme l'ont montré dès 1943, Wilbur et Collier (258) et en 1952, Collier (259). Les courbes représentatives ont la forme de sigmoïde, ce qui s'interprète par l'existence d'une phase de latence plus ou moins importante. Pour Maeno, Mitsunashi, Okonogi, Nishi et Homma (260), le caractère hémolytique des lysophosphatides libérés par l'action de la phospholipase A du venin de serpent Habu ne peut être de type enzymatique, d'après l'aspect des courbes.

L'étude des hémolysines bactériennes a été entreprise par Bernheimer (261), Cooper, Madoff et Weinstein (262) qui ont confirmé que la variation du degré d'hémolyse en fonction du temps était représentée par une courbe de forme sigmoïdale, pour laquelle la durée de l'induction prélytique varie de manière inversement proportionnelle à la concentration de la toxine.

Enfin, la vitesse d'hémolyse par la toxine staphylococcique α a été déterminée par Mangalo et Raynaud (263) d'après la relation,

$$\log T_{50} = - a \log (C) + b$$

où T_{50} représente le temps d'hémolyse 50 % des hématies et C la concentration en toxine, a et b étant des constantes.

II. - ETUDE CINETIQUE DE L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR LE VIRUS SENDAI.

A. - RELATION ENTRE LA CONCENTRATION D'HEMOGLOBINE LIBEREE ET LE NOMBRE D'HEMATIES HEMOLYSEES.

Un culot d'hématies humaines O Rh+, lavé quatre fois, est dilué à 8% ($S = 8$) à l'aide d'un soluté isotonique de chlorure de sodium. On procède alors à une dilution en progression géométrique de raison $1/2$ jusqu'à la concentration S égale à 0,25 % ($S = 0,25$).

Dans les conditions où nous nous sommes placés, l'hémoglobine totale libérée n'est pas proportionnelle au nombre d'hématies hémolysées, comme on le voit sur la figure 45 qui représente une courbe d'étalonnage. La fonction représentative est complexe, et seule une méthode de correction graphique permet de relier la densité optique D au nombre N d'hématies hémolysées.

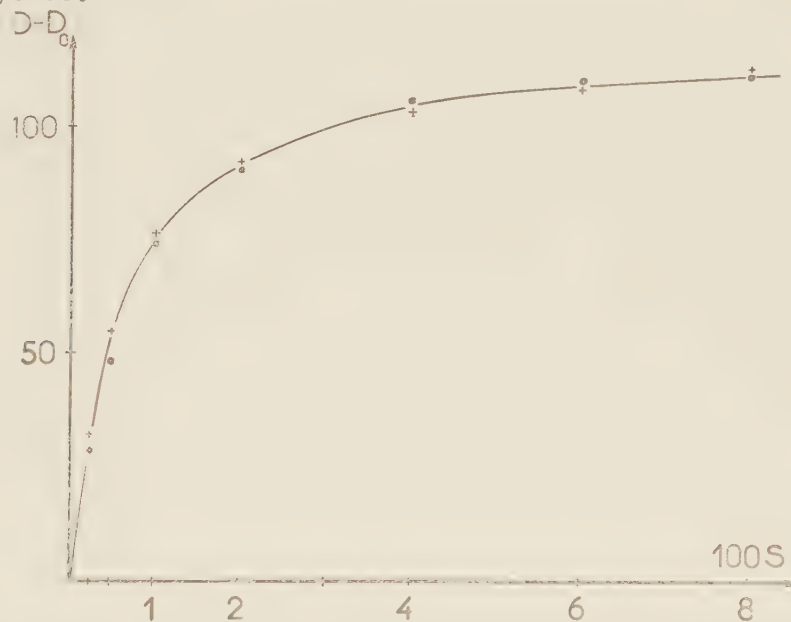


FIG. 45 - Relation entre la concentration d'hématies (S) et la densité optique de l'hémolyse totale vraie, exprimée en unités conventionnelles proportionnelles à la densité optique (1 unité conventionnelle = $9,6 \times 10^{-3}$),

D , densité optique de l'hémolyse totale,

D_0 , densité optique du témoin (hématies lysées par centrifugation).

On remarquera, que pour des faibles concentrations, et des densités optiques inférieures à 0,25 ou à 0,30, le facteur de correction est égal à l'unité.

B. - CINETIQUE DE L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR LE VIRUS SENDAI EN FONCTION DE SA CONCENTRATION.

Après une centrifugation à 6000 g pendant dix minutes, le liquide allantoïque infecté est titré suivant la méthode photométrique d'hémagglutination et la suspension mère est ramenée par convention à 160 unités Hirst ($C = 1$). Les dilutions, d'ordre $1/2$, sont effectuées en milieu salin tamponné jusqu'au $1/32^{\text{ème}}$. Après équilibrage préalable à la température de $+ 37^{\circ}\text{C}$, on met en présence un volume V de suspension globulaire et un volume $\frac{V}{9}$ de suspension virale. Les prélèvements de 5 ml, à des intervalles de temps déterminés et pendant 250 minutes, sont refroidis brusquement à 0°C et centrifugés à froid. On mesure alors la densité optique du surnageant à la longueur d'onde de 580 μ , correspondant à l'absorption maximale du spectre de l'hémoglobine. Les résultats sont donnés en unités conventionnelles du spectrophotomètre tricellule Jobin et Yvon, unités proportionnelles à la densité optique, une unité conventionnelle correspondant à $9,6 \times 10^{-3}$. Pour obtenir l'hémolyse totale, on congèle à la température de $- 70^{\circ}\text{C}$ le mélange constitué par 4,5 ml de suspension globulaire et 0,5 ml de solution tampon, puis on décongèle à la température de $+ 37^{\circ}\text{C}$. Cette opération est répétée jusqu'à disparition complète du culot d'hématies. Le pourcentage d'hémolyse des différents prélèvements est évalué par rapport à l'hémoglobine libérée dans l'hémolyse totale.

Lorsqu'on suit l'évolution du phénomène par la numération des hématies à l'aide de la cellule de Thoma, on observe une diminution de leur nombre, diminution de type exponentiel en fonction du temps, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse de Puck et Lee (264) pour lesquels un virus manifeste un pouvoir hémolytique en augmentant la perméabilité cellulaire vis-à-vis de l'hémoglobine sans détruire l'hématie.

Si on désigne par le symbole D_t la densité optique d'une suspension d'hématies à 1 % hémolysée complètement, par D_0 la densité optique de l'hémoglobine libérée du fait de la centrifugation chez les témoins, et par D la densité optique de l'hémolyse observée en présence de virus, la courbe représentative de l'hémolyse relative $\frac{D - D_0}{D_t - D_0}$ en fonction du temps est de type exponentiel (fig. 46).

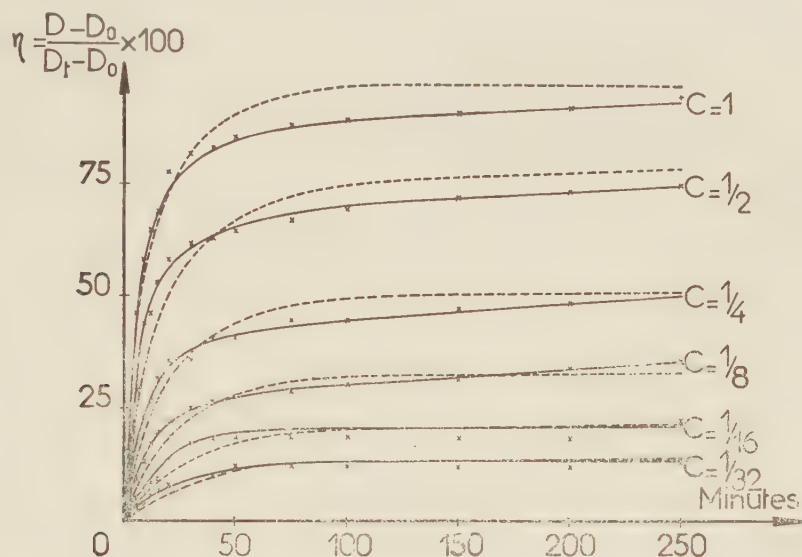


FIG. 46 - Pourcentage d'hémolyse en fonction du temps, pour différentes concentrations virales. La suspension globulaire est à 1 p. 100 dans tous les cas. Les courbes au pointillé représentent les courbes théorique établies d'après l'équation (3).

Sur ces données expérimentales, on trouve que la pente à l'origine p_0 est donnée par l'équation :

$$100 p_0 = (12,5 \pm 2) \cdot C \quad (1)$$

La limite atteinte par l'hémolyse est égale à :

$$100 \eta \text{ limite} = (120 \pm 10) \cdot C^{0,6 \pm 0,1} \quad (2) \quad (\text{figure 47 -A})$$

La pente à l'origine est proportionnelle à la concentration virale et la limite atteinte est voisine de la racine carrée de cette concentration. On peut assimiler aux courbes expérimentales, les courbes représentatives de l'équation

$$100 \frac{D-D_0}{D_t-D_0} = 100 \frac{\exp [p_0 (1-\eta_{\text{limite}}-1)t]-1}{\exp [p_0 (1-\eta_{\text{limite}}-1)t]-\eta_{\text{lim}}-1} \quad (3)$$

(figure 46, courbes au pointillé) pour laquelle les pentes calculées sont égales à :

$$p_0 = 0,12.C$$

et l'hémolyse limite à $\eta_{\text{limite}} = 1,20.C^{0,61}$

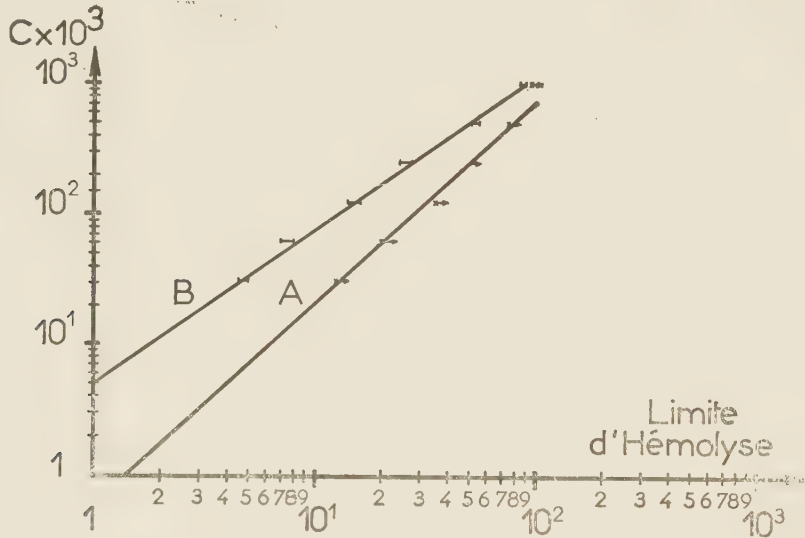


FIG. 47 - Etude de la limite d'hémolyse en fonction de la concentration virale (C), échelle logarithmique,

A, pourcentage d'hémolyse donné par la formule $\frac{D - D_0}{D_t - D_0} \times 100$

B, pourcentage d'hémolyse ramené au nombre d'hématies hémolysées $\frac{N_0 - N}{N_0} \times 100$.

Pour des faibles concentrations et pour des durées d'hémolyse assez

courtes, la formule (3) peut s'écrire en première approximation :

$$100 \frac{D-D_0}{D_t-D_0} = \frac{p_0 t}{1+p_0 t} = \frac{\alpha C t}{1+\alpha C t} \quad (4)$$

α étant une constante.

Si on fait le calcul en fonction du nombre d'hématies hémolysées à l'aide de la correction graphique (figure 45), on obtient, pour la courbe corrigée (figure 48) :

$$100 p_0 = (5 \pm 0,5) \cdot C \quad (5)$$

$$100 \eta_{\text{limite}} = (100 \pm 10) \cdot C^{0,86 \pm 0,2} \quad (6) \quad (\text{figure 47 - B})$$

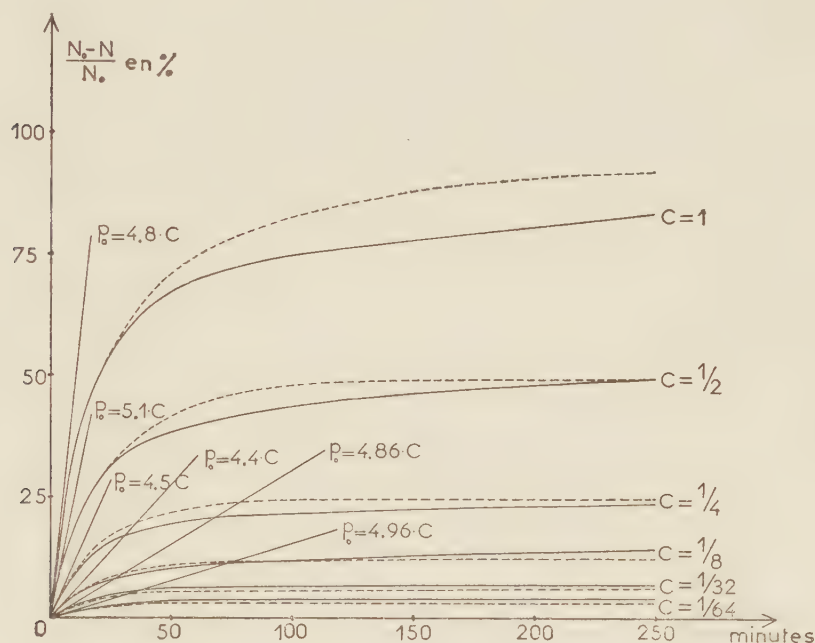


FIG. 48 - Pourcentage d'hémolyse rapporté au nombre d'hématies, en fonction du temps, pour des concentrations différentes de virus et pour une même concentration d'hématies ($S = I$). Les courbes au pointillé représentent les courbes théoriques établies d'après l'équation (7).

La pente initiale est toujours proportionnelle à la concentration virale, mais la limite atteinte au lieu d'être proportionnelle à la racine

carrée devient à peu près proportionnelle à cette même concentration. Ces courbes expérimentales se rapprochent de la relation :

$$100 \frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp [p_0 (1 - \eta_{\text{limite}}) t] - 1}{\exp [p_0 (1 - \eta_{\text{limite}}) t] - \eta_{\text{limite}}} \quad (7)$$

N_0 , nombre initial d'hématies au temps 0

N , nombre d'hématies non hémolysées au temps t .

Ces courbes théoriques représentées au pointillé sur la figure 48 ont une pente p_0 égale à 0,05 C. L'hémolyse limite est égale à

$$\eta_{\text{limite}} = 1/C$$

C - CINÉTIQUE DE L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR UNE CONCENTRATION DONNEE DE VIRUS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN HEMATIES.

Les courbes établies donnant la quantité d'hémoglobine libérée en fonction du temps, pour diverses concentrations en hématies (de $S = 8$ à $S = 0,25$) et pour une suspension virale unité ($C = 1$) montrent que la pente initiale est indépendante de S (figure 49),

$$100 p_0 = 5,5 \pm 0,5 \quad (8)$$

alors que la limite, atteinte par l'hémolyse ,est donnée par la relation :

$$100 \eta_{\text{limite}} = (80 \pm 10) S - (0,16 \pm 0,05) \quad (9)$$

(figure 50 - A)

Si nous traçons les courbes théoriques (figure 49 au pointillé) d'après la formule (3) en posant $p_0 = 0,055$ et $\eta_{\text{limite}} = 0,8 - 0,16$, la superposition des courbes est moins satisfaisante que dans la première série d'expériences; la correction graphique tenant compte de la figure 45 ne modifie pas le résultat (figure 51). La limite d'hémolyse devient égale à :

$$\eta_{\text{limite}} = (70 \pm 10) S - 0,8 \pm 0,2 \quad (9)$$

(figure 50 - B)

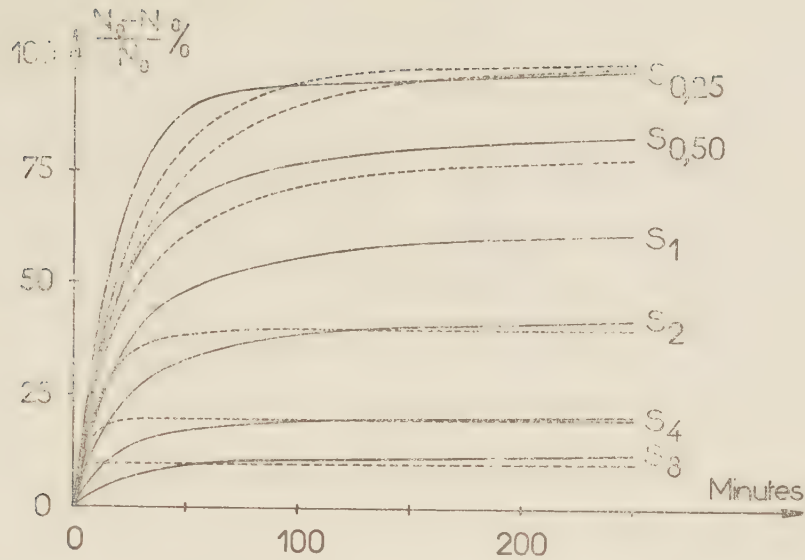


FIG. 49 - Pourcentage d'hémolyse en fonction du temps, pour des concentrations variées d'hématies et pour une même concentration virale ($C = 1$). Les courbes au pointillé représentent les courbes théoriques établies d'après l'équation (3).

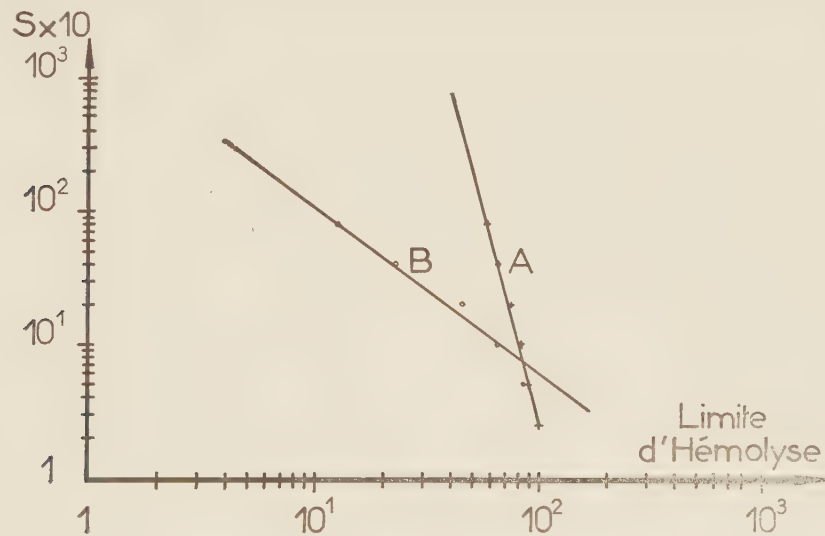


FIG. 50 - Etude de la limite d'hémolyse en fonction de la concentration en hématies (S), échelle logarithmique,

A, pourcentage d'hémolyse donné par la formule $\frac{D - D_0}{D_t - D_0} \times 100$

$$D_t - D_0$$

B, pourcentage d'hémolyse ramené au nombre d'hématies hémolysées

$$\frac{N_0 - N}{N_0} \times 100 .$$

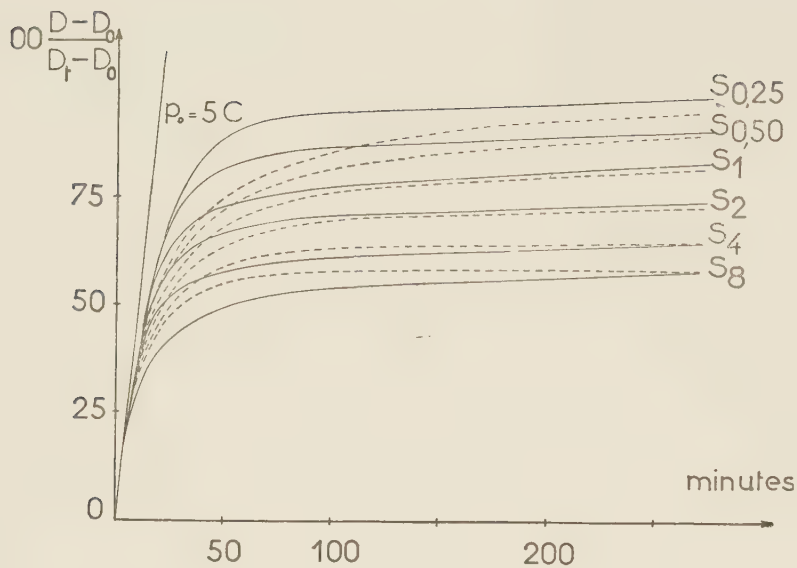


FIG. 51 - Pourcentage d'hémolyse, rapporté au nombre d'hématies, en fonction du temps, pour des concentrations différentes d'hématies et pour une même concentration de virus ($C = I$). Les courbes au pointillé représentent les courbes théoriques établies d'après l'équation (7).

D - CINETIQUE DE L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR LE VIRUS EN FONCTION DE LA NATURE DES HEMATIES.

Si on compare le degré d'hémolyse obtenu à l'aide d'une suspension virale à la concentration 0,5 sur des suspensions d'hématies de mouton à 1 % d'une part et sur des hématies humaines 0 Rh + à la même concentration d'autre part, on obtient, en fonction du temps, les résultats donnés dans le tableau XIX.

La loi d'hémolyse est la même, quelle que soit la nature des hématies, comme le montre la figure 52, mais les hématies de mouton semblent plus résistantes que les hématies humaines d'où la valeur différente des coefficients :

- 137 -

	temps (mn)	5	10	15	20	30	45	60	75	90	120
Hématies de mouton	Unités convention- nelles	10	15	16,5	17	20	21	21	24	23	23
	$\frac{N - N_o}{N}$	0,070	0,150	0,172	0,180	0,226	0,242	0,242	0,289	0,273	0,273
Hématies humaines O Rh+	Unités convention- nelles	14	21	30	35	38	43,5	47,5	50	51,5	53
	$\frac{N - N_o}{N}$	0,140	0,233	0,353	0,420	0,460	0,533	0,586	0,620	0,640	0,660

Tableau XIX - Comparaison en fonction du temps entre le degré d'hémolyse obtenu par une concentration fixe de virus (concentration 0,5) sur des hématies de mouton et des hématies humaines O Rh+ à la concentration de 1 %.

avec $D_o = 3,5$ et $D_t = 78,5$ pour les hématies O Rh +,
et $D_o = 5,5$ et $D_t = 69,5$ pour les hématies de mouton.

$$\text{hématies humaines} = \frac{D-D_0}{D_t-D_0} = \frac{\exp [0,07 C (1-1/\sqrt{C}) t] - 1}{\exp [0,07 C (1-1/\sqrt{C}) t] - 1/\sqrt{C}} \quad (10)$$

$$\text{hématies de mouton} = \frac{D-D_0}{D_t-D_0} = \frac{\exp [0,032 C (1-2,36/\sqrt{C}) t] - 1}{\exp [0,032 C (1-2,36/\sqrt{C}) t] - 2,36/\sqrt{C}} \quad (11)$$

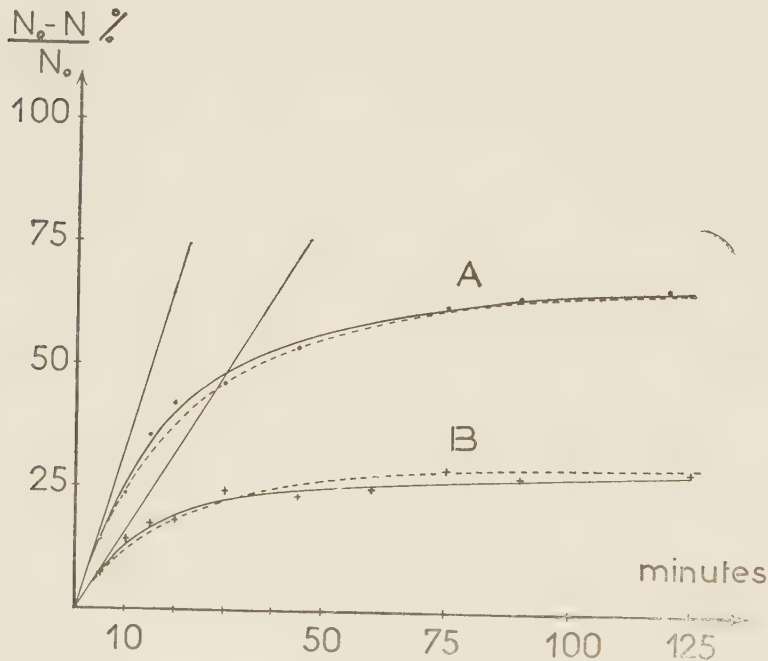


FIG. 52 - Comparaison entre l'hémolyse des hématies O Rh + (courbe A) et des hématies de mouton (courbe B) par Myxovirus parainfluenzae I.

III - ACTION DU pH SUR LA REACTION D'HEMOLYSE.

A l'aide d'un culot d'hématies O Rh +, lavé, on réalise une suspension à 1 % dans une solution isotonique de chlorure de sodium dont on fait varier le pH de 3,85 à 10,61 par l'addition de différents tampons (tableau XX). A 4,5 ml de cette suspension, on ajoute 0,5 ml de la suspension virale à étudier, dans le tampon correspondant, après que les deux suspensions aient été équilibrées à la température de

Nature du tampon	pH théorique	pH au pH mètre	pH du produit final, hématies + virus	% HL témoin	% HL réaction	% HL R - T
Acide acétique-	4,0	3,85	3,60	83	86	3
acétate 0,2M	5,0	4,78	4,83	90	92	2
phosphate 0,066 M	5,29	5,31	5,30	8	10	2
Acide acéti- que-acétate 0,2M	5,6	5,45	5,42	14	21	7
phosphate disodique - monopotas - sique 0,066 M	5,91	5,90	5,75	3	21	18
	6,47	6,48	6,31	3	24	21
	7,00	7,00	6,84	2	26	24
	7,38	7,40	7,26	2	33	31
Acide borique - borate 0,2 M	8,00	7,79	7,53	0	30	30
phosphate 0,066 M	8,04	8,05	7,78	5	30	25
Acide bori- que - bo- rate 0,2 M	8,9	8,54	8,50	0	30	30
	9,20	8,75	8,74	0	30	30
- idem - + soude		9,56	9,32	32	28	4
		10,61	10,73	100	100	0

Tableau XX - Action du pH sur la réaction d'hémolyse.

+ 37°C. Au bout d'une heure, on refroidit à 0° C, on centrifuge et on mesure la densité optique du surnageant à 580 mμ. Le tableau XX montre que l'hémolyse atteint une valeur maximale pratiquement constante dans la zone des pH comprise entre 7,20 et 8,75.

IV - ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LA REACTION D'HEMOLYSE.

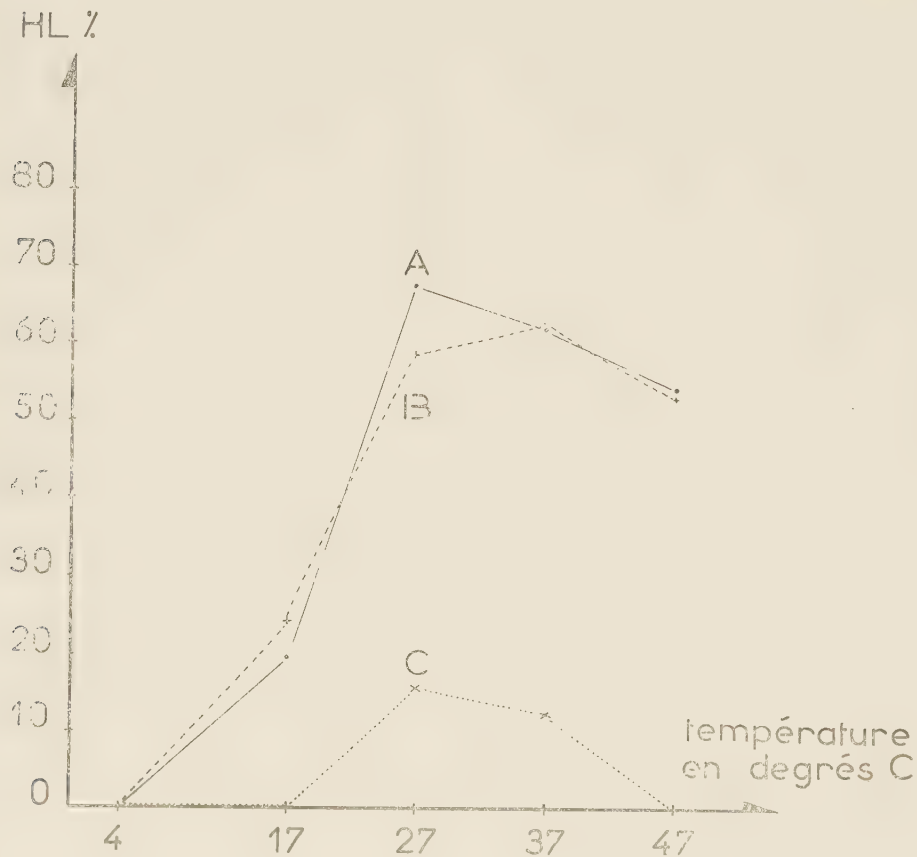


FIG. 53 - Action de la température sur la réaction d'hémolyse,

A, hématies humaines O Rh -

B, hématies humaines O Rh +

C, hématies de mouton.

La réaction précédente, tamponnée à pH 7,4 est équilibrée à des températures différentes. Comme on montre la figure 53, le degré d'hémolyse dépend fortement de la température que ce soit avec des hématies de mouton, faiblement hémolysées, ou avec des hématies du groupe O dont l'hémolyse est indépendante du facteur rhésus.

V - DISCUSSION.

- RECHERCHE D'UNE UNITE CONVENTIONNELLE D'HEMOLYSE.- Du point de vue pratique, la détermination de la concentration virale par la mesure du pourcentage d'hémolyse est possible, puisque les courbes représentatives de $\frac{D - D_0}{D_t - D_0}$ en fonction du temps, présentent les caractéristiques suivantes:

- a) pente à l'origine indépendante de la concentration en hématies S
- b) pente à l'origine proportionnelle à la concentration virale C,
- c) limite atteinte par l'hémolyse proportionnelle à C.

On pourra donc déterminer la pente à l'origine en effectuant des prélèvements rapprochés pendant trente à quarante minutes. Malheureusement, ces mesures ne pourront être que relatives, puisque l'expérience montre que le degré d'hémolyse varie beaucoup d'un lot d'hématies à l'autre.

Pour éliminer cet inconvénient, chaque expérience devrait être rapportée à un nombre d'hématies défini exactement, par exemple à l'aide d'une numération globulaire, mais la technique se complique alors au point de perdre son intérêt pratique.

On pourrait alors comparer toute nouvelle suspension virale à une suspension étalon, mais étant donné le défaut de précision de la technique classique d'hémagglutination et les résultats aléatoires observés tant du point de vue hémagglutinant que du point de vue hémolytique, lorsque la suspension virale a été conservée, il est illusoire de chercher à définir une unité hémolytique absolue.

Nous nous contenterons donc, au cours de nos titrages, d'évaluer le pouvoir hémolytique de nos suspensions par le pourcentage d'hémolyse obtenu dans des conditions définies de pH et de température, par rapport à l'hémolyse totale. Il convient naturellement, pour que la mesure ait quelque précision, que l'hémolyse obtenue ne soit pas totale.

- MESURE DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE.- En définitive, les conditions normalisées dans lesquelles nous nous plaçons pour mesurer l'activité hémolytique sont les suivantes.

On prépare tout d'abord une suspension à I p. 100 d'hématies humaines du groupe O Rh + en tampon de Cox et Pirtle * (92) pH 7,4. Dans un tube à essais on mesure 4,5 ml de cette suspension d'hématies que l'on place au bain-marie à + 37°C. Lorsque l'équilibre de température est atteint, on ajoute 0,5 ml de la suspension hémolytique dans ce même tampon. Au bout de soixante minutes exactement, l'hémolyse est arrêtée en plongeant les tubes dans un bain froid à 0°C. On centrifuge à froid. La densité optique du surnageant, mesurée au spectrophotomètre à 580 mμ est rapportée à celle donnée par l'hémolyse totale d'un même volume de suspension d'hématies, ce qui permet d'exprimer l'activité hémolytique en pourcentage d'hémolyse.

Le phénomène général de l'hémolyse provoquée par Myxovirus parainfluenzae I peut être représenté par l'équation suivante :

$$\frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp[\beta_1 C (1 - \beta_2 S/C)t] - 1}{\exp[\beta_1 C (1 - \beta_2 S/C)t] - \beta_2 S/C}$$

où N désigne le nombre d'hématies non hémolysées au temps t , N_0 le nombre initial d'hématies, C la concentration en virus et S la concentra-

* Tampon de Cox et Pirtle : Na Cl 0,137 M
 PO₄ H Na₂ , I2 H₂O 0,01 M
 PO₄ H₂ K 0,003 M
 eau distillée q.s.p. 1000

tion initiale en hématies. β_1 et β_2 sont des constantes.

La complexité de la cinétique, due à l'intervention d'un nombre élevé de paramètres rend impossible la comparaison rigoureuse de lots différents de virus.

DEUXIEME PARTIE

RAPPORTS

ENTRE LA STRUCTURE

ET LES PROPRIETES BIOLOGIQUES

CHAPITRE PREMIER

HYPOTHESE DE LA NATURE PHOSPHATIDIQUE DE L'HEMOLYSINE CHEZ MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I

Les techniques de dosage de l'activité enzymatique, de l'hémagglutination et de l'hémolyse nous ont permis d'étudier les propriétés en rapport avec la structure de Myxovirus parainfluenzae I.

Pour Douste-Blazy (265) le rôle des lipides dans le phénomène général de l'hémolyse est primordial. Toute substance qui se combine, soit physiquement par adsorption, soit chimiquement, avec des constituants lipidiques de l'hématie peut provoquer une hémolyse. Si l'action des détergents ou celle des produits chimiques tels que le benzène, l'éther, est facile à interpréter par l'altération du rempart lipoprotéinique, l'hémolyse provoquée par un virus demeure un phénomène mystérieux, bien que Klemperer (266) ait montré que la première étape est un gonflement des hématies, s'accompagnant d'une augmentation de la perméabilité, d'une libération des ions K^+ et se trouve inhibé par l'antisérum viral correspondant. Il paraît donc logique d'admettre comme hypothèse de travail que les lipides viraux (Knight (267) joueraient un rôle dans l'hémolyse de Myxovirus parainfluenzae I d'autant que ce virus perd cette propriété en même temps que sa structure est détruite, lorsqu'on le traite par l'éther ou par un moyen aussi doux que la phospholipase C.

Pour Kates, Allison; Tyrell et James (268, 269) l'origine des lipides constitutifs du virion est cellulaire. En effet, les lipides chez les

Myxovirus cultivés sur embryons de poulet se montrent très différents de ceux provenant d'une culture sur cellules de rein de veau mais présentent en revanche une forte ressemblance avec les lipides des cellules-hôtes respectives. Cependant, cette similitude ne serait pas toujours aussi marquée, car les lipides des virus grippaux proviendraient à la fois de ceux de la cellule avant l'infection et de constituants nouvellement synthétisés par la cellule infectée. Une infection sévère s'accompagnerait d'une augmentation de la concentration en acides phosphatidiques.

C'est la présence en quantité importante de lipides cellulaires dans ce groupe de virus hémolytiques, encore appelés virus multiformes par Franklin (270, 271) à cause des variations de taille et de forme pour une même espèce et l'absence d'activité hémolytique après passage sur culture cellulaire de poumon de souris (Matsumoto et Maeno (272)), qui nous a fait soulever l'hypothèse de la nature lysophosphatidique de l'hémolysine.

Morimoto et Morgan (273) en 1954, montrèrent, pour la première fois que l'activité lytique du virus ourlien pour les hématies, était inhibée en présence de lécithine ou de cholestérol aux concentrations respectives de 0,4 mg/ ml et de 0,09 mg/ ml, en insistant sur le fait que l'activité hémagglutinante n'était pas affectée. Domonkos (274) retrouve le même phénomène avec les esters d'acides gras.

L'observation de ce phénomène rappela l'hypothèse de Gardner et Morgan (275) dans laquelle l'hémolyse pouvait être produite par une lécithinase qui détacherait un acide gras de la lécithine pour former la lysolécithine.

De leur côté, Moberly, Marinetti, Witter et Morgan (276) étudièrent par chromatographie les extraits de la membrane des hématies de poulet et mirent en évidence la libération de sphingomyéline après une action

du virus ourlien, mais cette altération pouvait être une manifestation secondaire plutôt que la cause de l'hémolyse. Cette analyse chromatographique ne décela pas de trace de lysolécithine. La destruction secondaire de cette substance ne pouvait être envisagée, puisque l'addition de ce phospholipide permettait de le retrouver intact dans les chromatogrammes.

Hosaka (277, 278) trouva également une libération de sphingomyéline à partir d'hématies de poulet mises en contact avec des virus hémolytiques tel que le virus Sendai ou le virus de la maladie de Newcastle, alors qu'il ne remarquait aucune variation lorsque ces derniers étaient remplacés par des Myxovirus non hémolytiques. Cependant, aucune relation entre la cinétique d'hémolyse et la libération de sphingomyéline ne put être établie.

Pour Soule, Marinetti et Morgan (279) il existerait deux phénomènes bien distincts au cours de l'hémolyse des hématies de poulet par le virus ourlien, d'une part un clivage des liaisons sphingomyéline - protéine et d'autre part une dégradation de la sphingomyéline, ce qui oblige à admettre l'hypothèse d'une sphingomyélinase virale.

L'absence de lecithine des hématies de mouton qui sont également lysées par le virus ourlien paraît être une preuve suffisante pour éliminer l'hypothèse de la lecithinase virale responsable de l'hémolyse par libération d'un lysophosphatide.

A la suite de travaux préliminaires (Rebel, Fontanges et Colobert (281) nous avons conclu à la possibilité de libération des lysophosphatides au cours de la nécrose cellulaire, plutôt que d'admettre une activité phosphatidasique des virions; nous avons donc entrepris l'étude théorique des cinétiques d'hémolyse à partir d'hypothèses simples et comparé les résultats avec les courbes expérimentales décrites dans notre précédent chapitre. Devant la possibilité d'expliquer le phénomène hémolytique par un processus identique à celui mis en oeuvre par la lysolécithine, nous avons alors étudié les propriétés de cette dernière et nous nous sommes appliqués

à l'identifier parmi les constituants lipidiques de Myxovirus parainfluenzae I (Fontanges, Héritier et Coeur (282)).

I - ETUDE THEORIQUE DES CINETIQUES D'HEMOLYSE

Posons comme première hypothèse que le nombre d'hématies hémolysées est proportionnel au nombre de particules virales hémolysantes V , et au nombre d'hématies N . On peut écrire la loi d'hémolyse sous forme d'équation différentielle :

$$d N\eta = - d N = \beta_I \cdot V \cdot N \cdot dt \quad (I2)$$

$d N\eta$ étant le nombre d'hématies hémolysées pendant le temps dt , β_I un coefficient dépendant de la température, de la nature des hématies et des traitements subis par les hématies et le virus.

Si nous admettons maintenant que le nombre des particules hémolysantes qui disparaissent est proportionnel au nombre d'hématies hémolysées, nous pouvons écrire :

$$d V = - \gamma_I \cdot d N\eta \quad (I3)$$

le coefficient γ_I dépend des mêmes paramètres que β_I . De ces deux équations, nous tirons successivement :

$$\begin{aligned} N\eta &= N_0 - N \\ V &= V_0 - \gamma_I (N_0 - N) \end{aligned}$$

N_0 représentant le nombre initial d'hématies,

N , le nombre d'hématies au temps t ,

V_0 , le nombre initial d'agents hémolysants et

V , le nombre d'agents hémolysants au temps t .

$$dN = -\beta_I (V_0 - \gamma_I (N_0 - N)) N \cdot dt$$

La solution de cette équation différentielle devient :

a) si $V_0 = \gamma_I N_0$, c'est-à-dire s'il y a juste assez de virus pour hémolyser toutes les hématies :

$$\eta = \frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\beta_I V_0 t}{1 + \beta_I V_0 t} \times 100 \quad (14)$$

b) si $V_0 \neq \gamma_I N_0$,

$$\eta = \frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp[\beta_I V_0 (1 - \gamma_I N_0 / V_0) t] - 1}{\exp[\beta_I V_0 (1 - \gamma_I N_0 / V_0) t] - \gamma_I N_0 / V_0} \times 100 \quad (15)$$

Comme $V_0 = kC$, on peut poser,

$$p_0 = \beta_I V_0 = \beta C \text{ et } q_0 = \gamma_I \frac{N_0}{V_0} = \gamma_I \cdot \frac{S}{C}$$

puisque $N_0 = k'S$.

La pente initiale des courbes d'hémolyse, égale à p_0 dépend donc directement de la concentration de la suspension virale, mais ne dépend pas de la concentration en hématies. De plus, quel que soit q_0 , l'hémolyse complète ne peut être atteinte qu'après un temps infini. Si $q_0 > 1$, l'hémolyse tend vers une limite donnée par la relation

$$\eta_{\text{limite}} = \frac{1}{q_0}$$

Considérons la première série d'expériences exposée au cours du chapitre précédent. Lorsque l'hémolyse provoquée par le virus tend vers

une limite inférieure à l'hémolyse totale, cette limite est proportionnelle à la concentration virale, suivant la relation générale :

$$\frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp[\alpha_1 C (1 - \alpha_2 / C) t] - 1}{\exp[\alpha_1 C (1 - \alpha_2 / C) t] - \alpha_2 / C} \quad (16)$$

α_1 et α_2 désignant des coefficients qui peuvent dépendre de la concentration, de la nature des hématies et de la température.

Dans la seconde série d'expériences, les courbes expérimentales obtenues en fonction de la concentration en hématies (fig. 51) montrent que la pente initiale dépend de la concentration S. Dans ce cas, la formule théorique ne serait pas valable, mais si l'on tient compte des courbes expérimentales et surtout de l'imprécision des corrections nécessaires pour passer de $D - D_0$ à $N - N_0$, on peut encore admettre que l'hémolyse à la température de + 37°C, pour Myxovirus parainfluenzae I, est représentée par la formule :

$$\frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp[\beta_1 C (1 - \beta_2 S / C) t] - 1}{\exp[\beta_1 C (1 - \beta_2 S / C) t] - \beta_2 S / C} \quad (17)$$

N_0 , nombre initial d'hématies,

N , nombre d'hématies au temps t,

C , concentration initiale en virus ($C = I$ pour une suspension virale titrant 160 U. HA),

S , concentration initiale en hématies ($S = I$ pour une suspension au 1/100),

β_1 , coefficient indépendant de S et de C, de l'ordre de 0,1,

β_2 , coefficient indépendant de S et de C, de l'ordre de 1.

La comparaison entre les équations (15) et (17) conduit à penser que les hypothèses sur lesquelles sont basées les déductions théoriques sont plausibles, c'est-à-dire que l'hémolysine, après avoir détruit une hématie, est incapable de se libérer pour en détruire une autre. On sait

que la lysolécithine après l'hémolyse, se comporte de la sorte. Ainsi Collier (259) a montré que la lysolécithine après hémolyse demeure fixée aux hématies ou à leurs débris.

Il s'agit maintenant de vérifier la présence de ces lysophosphatides par des micro-méthodes spécifiques d'analyse.

II - MATERIEL ET METHODES D'ETUDE DES LYSOPHOSPHATIDES

A - METHODE DE MICROSPPECTROGRAPHIE INFRAROUGE APPLICABLE AUX LIPIDES.

L'extraction des lipides totaux d'une substance biologique soit par la méthode de Folch (283) soit par la méthode de Thiele (284) suivie par la séparation des diverses fractions par chromatographie sur colonne, conduit ordinairement à de très faibles quantités de produits.

Or, l'étude en spectrographie infrarouge des fractions obtenues est difficile à réaliser par le procédé des micropastilles de bromure de potassium, qui sont opaques. En phase liquide, en solution chloroformique par exemple, il est difficile de manipuler des volumes inférieurs à 0,1 ml, ce qui nécessite encore de 3 à 4 mg de produit.

Nous avons ainsi été amenés à mettre au point, d'une part, une technique d'élution de taches obtenues par chromatographie en couche mince sur gel de silice, d'autre part, une micro-méthode de spectrographie infrarouge permettant l'identification du produit. Les meilleurs résultats ont été obtenus par dépôt du lipide sur une mince couche d'argent.

a) Méthode d'élution des taches de chromatographie en couche mince. - Sur des plaques de verre soigneusement dégraissées, on dépose une couche de 0,5 mm d'épaisseur, et non pas de 0,25 mm comme on le fait d'or-

dinaire, de gel de silice G préparé suivant Stahl (285). Le lipide à étudier est déposé soit par juxtaposition rapprochée sur la ligne de base, soit par trainées renouvelées sur cette même ligne. La plaque chargée est placée verticalement dans une cuve à chromatographie ascendante. Après migration sur une longueur de 12 cm et séchage, on révèle en lumière ultraviolette les deux bords latéraux de la plaque par pulvérisation d'une solution à 0,05 p. 100 de rhodamine, la partie centrale étant protégée par un cache.

La silice, imprégnée du lipide à identifier repéré par cette technique, est prélevée à l'aide de micropelles métalliques, puis placée à l'aide de microentonnoirs de verre dans une microcolonne garnie de laine de verre à l'extrémité inférieure. Chaque microcolonne de 150 mm de longueur est constituée par un tube de verre de 8 mm de diamètre extérieur et de 4,5 mm de diamètre intérieur, muni d'un robinet rodé, et terminé par une goutte de verre pendante sur une section en bec de flûte. La silice, imprégnée du produit à éluer, est tassée soigneusement à l'aide d'une baguette de verre calibrée, puis recouverte par le mélange d'élution, par exemple dans le cas des phospholipides, par le mélange chloroforme/méthanol/eau : 400 : 100 : 4 (v/v), ou encore par le diméthylformamide.

La quantité de liquide d'élution est de l'ordre de 10 à 20 ml, variable selon la quantité du produit à identifier (10 à 200 microgrammes). Pour faciliter cette élution, chaque microcolonne fonctionne sous air comprimé deshydraté, sous pression de 1, 2 à 1,5 kg/cm^2 . L'éluat est recueilli dans des pots bouchés à l'émeri puis desséché sous vide. Dans le cas d'une élution par le diméthylformamide, il est nécessaire de favoriser l'évaporation du solvant par l'utilisation d'un bain-marie à 100°C.

Un appareillage, simple et pratique, peut être réalisé avec dix microcolonnes fonctionnant simultanément (fig. 54).

b) Technique de microspectrographie infrarouge. - L'appareil est un spectrographe Leitz n° 150, équipé d'un prisme NaCl, de réseaux à 300 traits

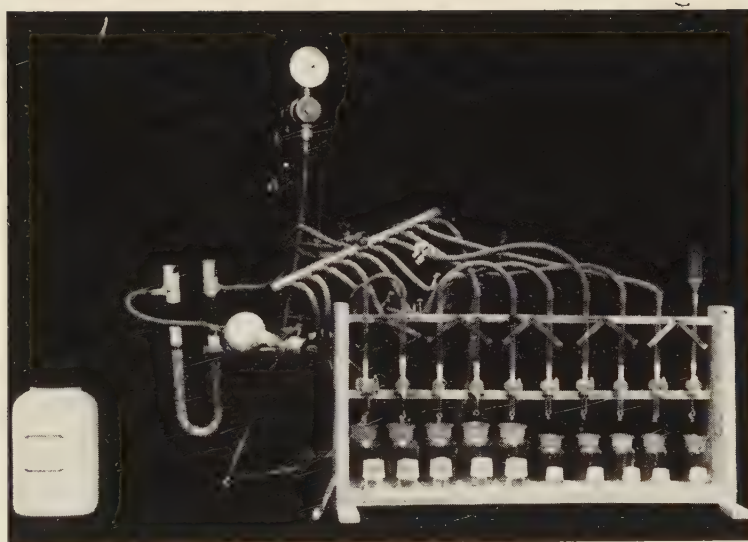


FIG. 54 - Dispositif d'élution des taches de chromatographie en couche mince.

et à 150 traits par millimètre, utilisant la partie optique (fig. 55) du microappareillage Leitz. Le principe de ce dernier repose sur le double passage du rayonnement infrarouge à travers la substance, la réflexion étant obtenue grâce à une plaque d'argent.

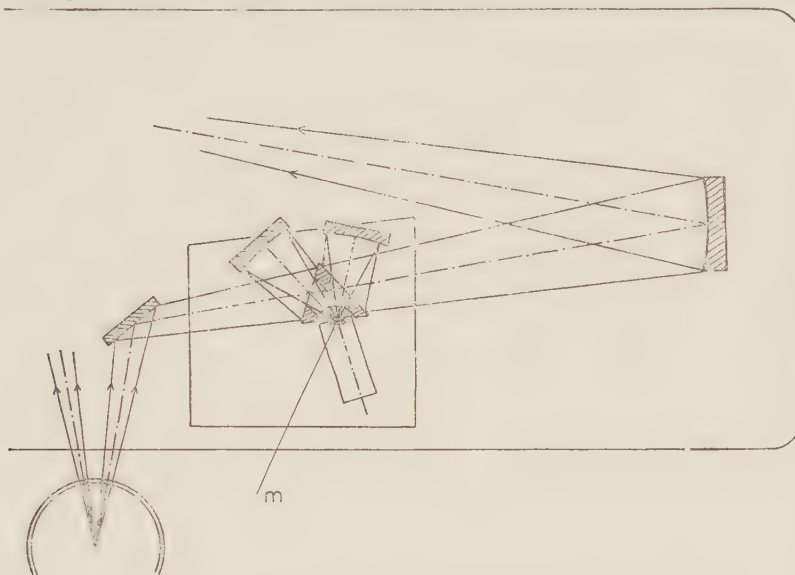


FIG. 55 - Dispositif optique du microappareillage Leitz, avec focalisation sur miroir d'argent (m).

Dans notre dispositif, nous utilisons des miroirs d'argent fabriqués de la manière suivante,

Des petits carrés de verre de 10 mm de côté, soigneusement nettoyés au mélange sulfonitrique, puis à la soude concentrée, sont plongés dans un tube à essais contenant environ 5 ml d'une solution de nitrate d'argent ammoniacal (350 g par litre). On verse 1 ml d'une solution de formol à 20 %. Le dépôt d'argent apparaît aussitôt. On rince à l'eau distillée et à l'alcool et on sèche le petit miroir qui est alors monté sur son support (fig. 56). Celui-ci est constitué de deux pièces métalliques (A) et (C) vissées l'une dans l'autre, et présentant le miroir (M) protégé par un cylindre de caoutchouc (B) devant une ouverture tronconique de 6 mm de diamètre de petite base. Un joint de téflon (E) en couronne, assure l'étanchéité. Ce support est placé dans un manchon (F) cylindrique,

muni d'une face plane latérale; une vis (G) assure la fixité. Le produit à identifier et desséché sous vide est repris par 0,1 ml de chloroforme et déposé à l'aide d'une pipette effilée au centre du miroir. Après évaporation du solvant, il reste un dépôt très léger de lipide qui est amené au point de convergence du faisceau infrarouge à l'aide de la glissière sur laquelle repose le support.

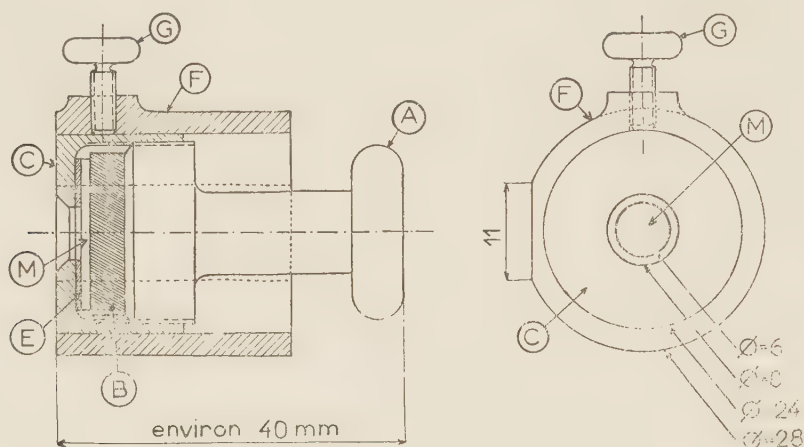


FIG. 56 - Support des miroirs d'argent

- A, vis de serrage
- B, cylindre de caoutchouc
- C, cylindre extérieur
- E, joint de téflon
- F, manchon
- G, vis de serrage
- M, miroir d'argent.

c) Résultats. - De très bons spectres d'identification de la lécitine ont été obtenus, sans extenseur d'échelle, soit dans la région de 2 à 15 μ (fig. 57) soit entre 1 et 4 μ (fig. 58) avec des quantités de l'ordre de 20 microgrammes. Avec 100 microgrammes (fig. 59) la transmission est de 18 p. 100.

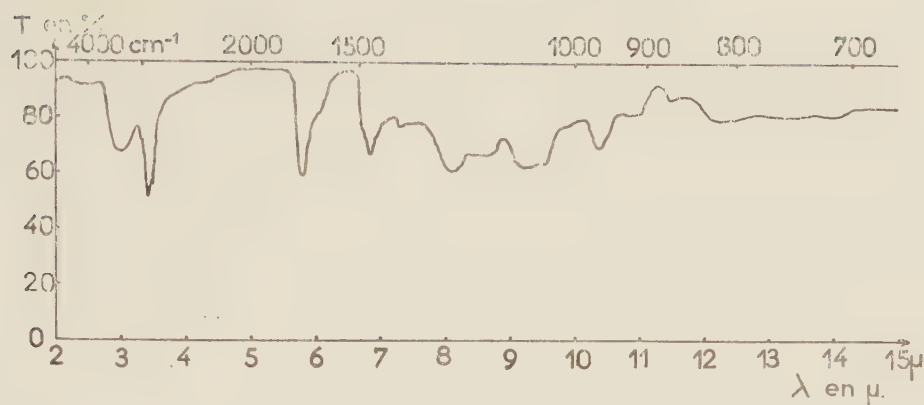


FIG. 57 - Spectre infrarouge d'un dépôt de 22 microgrammes de lécithine,

prisme NaCl , programme de fente : 3,6,

amplification : 5,8, amortissement : 7,2.

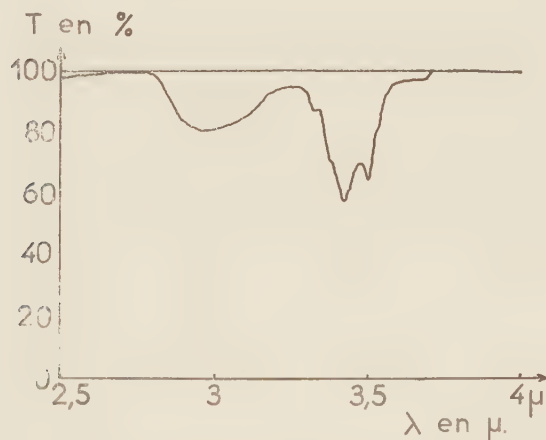


FIG. 58 - Spectre infrarouge d'un dépôt de 22 microgrammes de lécithine,

réseau 300 traits/mm, programme de fente : 3,90,

amplification : 5,8, amortissement : 10.

Lorsqu'on se contente d'un diagnostic d'exclusion ou d'un diagnostic d'orientation par le repérage de bandes caractéristiques, la quantité nécessaire devient très faible. Ainsi, dans le cas des phospholipides, il

est aisé de caractériser la sphingomyéline par son doublet à 1653 cm^{-1} ($6,05\text{ }\mu$) et à 1538 cm^{-1} ($6,50\text{ }\mu$), la lécithine par sa bande à 964 cm^{-1} ($10,37\text{ }\mu$), la céphaline par sa bande à 1020 cm^{-1} ($9,80\text{ }\mu$), avec des quantités de l'ordre de 10 microgrammes.

Des résultats similaires ont été obtenus, dans les mêmes conditions, avec les acides gras et les esters d'acides gras.

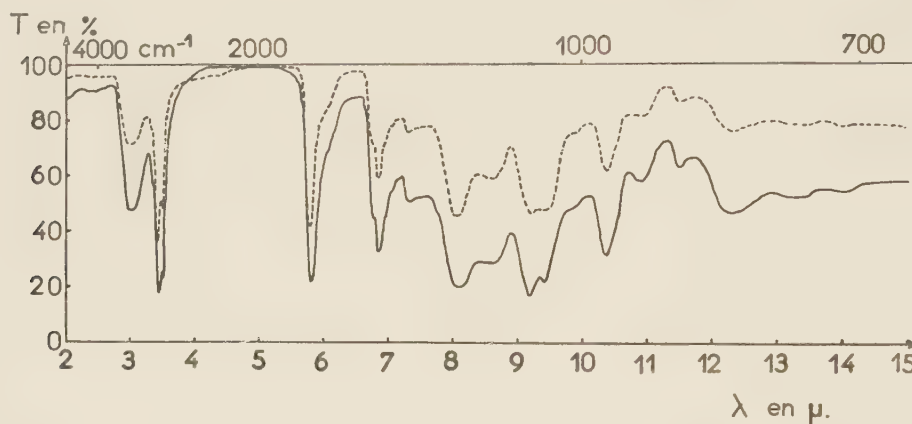


FIG. 59 - Spectre infrarouge de 50 microgrammes (trait au pointillé) et de 100 microgrammes (trait plein) de lécithine ,

Programme de fente : 3, amplification : 5,8, amortissement : 7,2.

B - OVOLECITHINE.

On triture un jaune d'oeuf avec 50 ml d'acétone. Après décantation et filtration, on renouvelle ce traitement tant que l'acétone passe colorée. Le précipité, exprimé entre deux feuilles de papier filtre, est épuisé par 50 ml de chloroforme. La fraction insoluble qui contient les protéines est rejetée, tandis que la fraction soluble, constituée principalement de phospholipides est purifiée par chromatographie sur une colonne de 30 mm de diamètre et remplie sur une hauteur de 80 mm par 25 g d'acide silicique (Mallinckrodt 100 Mesh) deshydraté préalablement pendant 24 h à la température de $+110^{\circ}\text{C}$, puis lavé successivement par du méthanol et du chloroforme. L'élution de la phosphatidylcholine est réalisée suivant la technique de Lea, Rhodes

et Stoll (286) modifiée par Phillips (287), par le mélange chloroforme à 1,35 p. 100 d'eau-méthanol, 80 : 20 (v/v), après élution de la fraction I (acides gras, neutres) par le chloroforme pur, et la fraction II (céphalines) par le mélange chloroforme-méthanol 80 : 20 (v/v). Les coefficients d'élution utilisés sont respectivement, pour les fractions I, II, et III de 17,5 P, 17,5 P, 60 P, P étant la quantité en grammes de silice supportée par la colonne. L'expérience est réalisée à température ordinaire, sous pression d'azote pur. La lécithine obtenue est débarrassée de ses impuretés azotées, décelables par leur coloration à la ninhydrine sur plaque de gel de silice, par passage sur une colonne de cellulose de 2 cm de diamètre et de 70 cm de hauteur, préparée selon la technique de Lea et Rhodes (286). Le solvant d'élution est le chloroforme. Pour 100 mg de lécithine, on utilise environ 200 ml de chloroforme. La pureté des échantillons recueillis est contrôlée par spectrographie infrarouge (fig. 60, A et C) et par chromatographie en couche mince de gel de silice (fig. 6I A) selon Stahl (285), après révélation par la rhodamine en solution alcoolique à 0,05 %, et mise en évidence sous lumière ultraviolette.

C - LYSOLECITHINE.

La lysolécithine provient de l'action de la lécithinase A cristallisée * du venin de cobra (*Crotalus adamanteus*) contrôlé par spectrographie infrarouge (fig. 60 D), sur la lécithine précédemment purifiée et reprise dans l'éther déperoxydé suivant la technique de Hanahan, Rodbell et Turner (288). On la sépare des acides gras libérés et du reliquat de lécithine, par la méthode de chromatographie sur colonne, décrite ci-dessus. Ce lysophosphatide est élué dans la fraction IV, par le méthanol pur, à coefficient d'élution 10 P. On contrôle la pureté du produit obtenu par chromatographie en couche mince (fig. 6I B) suivi de microspectrographie infrarouge (fig. 60 B).

* un échantillon nous a été obligeamment fourni par Monsieur le Professeur Raynaud de l'Institut Pasteur de Garches.

La composition en acides gras libérés étant fonction, d'après Moore et Williams (289), de la vitesse d'hydrolyse, nous avons utilisé un temps de contact supérieur à 15 minutes.

Des études parallèles ont été conduites avec la lysocéphaline, mais sa faible solubilité nous a fait préférer la lysolécithine pour l'établissement des cinétiques.

D - ACIDES GRAS.

L'action de la lécithinase A du venin de cobra sur la lécithine libère des acides gras qui sont isolés, dans un premier temps, dans le surnageant de centrifugation, après apparition du trouble dû à l'insolubilité des produits de dégradation de la lécithine dans l'éther, puis, dans un second temps, sur microcolonne de chromatographie après élution dans le solvant I. La pureté des produits récoltés est également contrôlée sur plaque de chromatographie (fig. 61 C) et par microspectrographie infrarouge (fig. 60 C).

E - METHODES D'HEMOLYSE.

Lorsqu'on veut rechercher le pouvoir hémolytique des lipides isolés après chromatographie sur colonne, on procède de la manière suivante,

On dissout un poids commun des lipides à éprouver dans un mélange constitué par 0,5 ml de solution neutralisée de polyvinyl-pyrrolidone à 25 p. 100 * et par 3,5 ml de solution de chlorure de sodium à 9 g p. 1000, que l'on place pendant douze heures à l'étuve à + 37°C en agitant de temps en temps. On prépare d'autre part une suspension à 1 p. 100 de culot d'hé-

* Subtosan retard 25, Specia, 21, rue de Jean Goujon, Paris 8°.

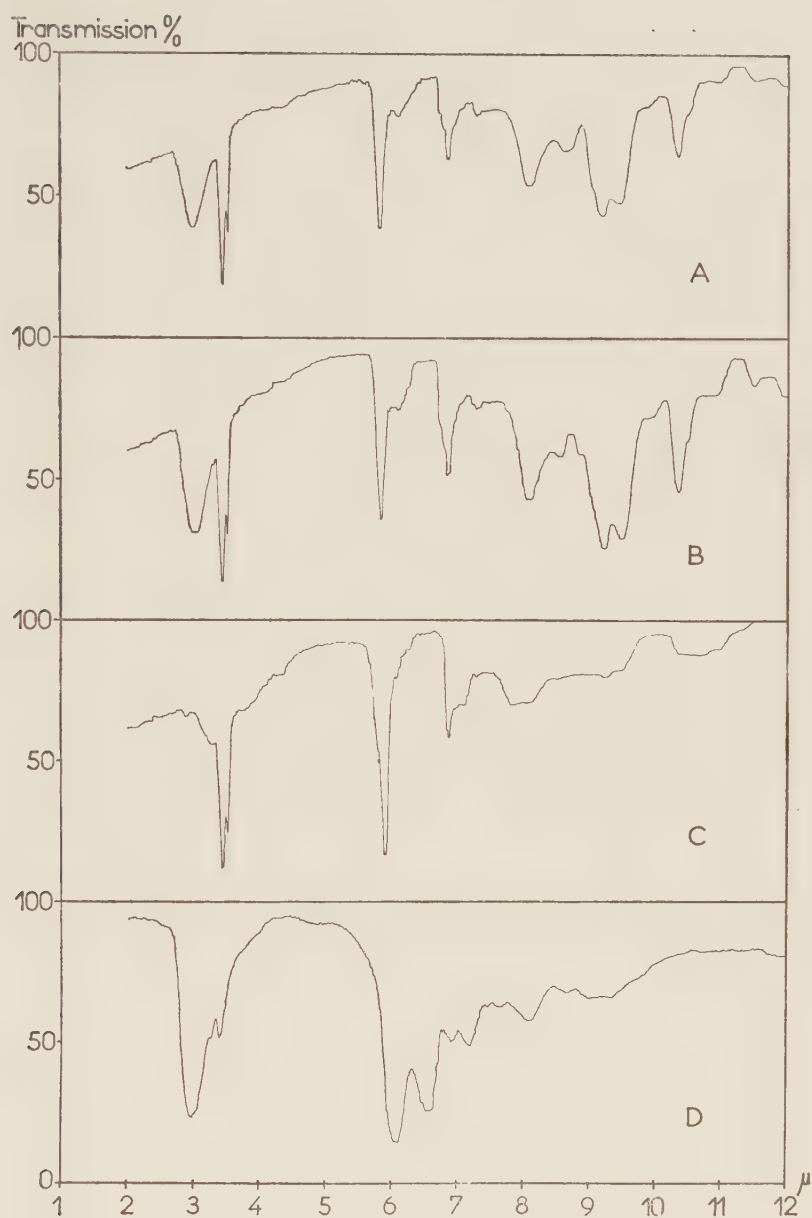


FIG. 60 - Spectres infrarouges de la lécithine (A), de la lyso-lécithine (B), des acides gras (C) et du venin de cobra (D).

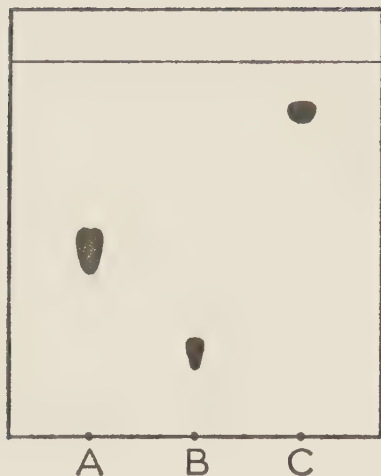


FIG. 61 - Chromatographie en couche mince de lécithine (A), de lysolécithine (B) et d'acide gras (C).

maties humaines 0 Rh + dans le mélange à volume égal d'une solution de chlorure de sodium à 9 g p. 1000 et d'une solution de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4. Pour mesurer le pouvoir hémolytique, on ajoute 5 ml de cette suspension aux 4 ml de la solution de lipides. Après trois heures d'incubation à l'étuve à + 37°, on centrifuge pour éliminer les hématies non détruites et on lit au photomètre à 580 m μ la densité optique du surnageant.

Dans le cas d'une étude cinétique de l'hémolyse, la solution chloroformique finale de lysolécithine ou d'acide gras, est évaporée sous vide et le résidu pesé. Les solutions mères, effectuées dans l'alcool absolu, sont portées à la dilution au 1/100ème. A 1 ml de cette solution employée pure ou diluée du 1/2 au 1/1000ème, on ajoute, après équilibrage des températures, 4 ml de tampon Cox (92) et 45 ml d'une suspension d'hématies 0 Rh+, à la concentration de 1 p. 100 dans ce même tampon. Chaque prélèvement de 5 ml, en fonction du temps, est immédiatement centrifugé à 3500 tours pendant cinq minutes. Le surnageant est recueilli et la densité optique est mesurée à l'électrophotomètre, à la longueur d'onde de 580 m μ .

III - RESULTATS DE L'ETUDE DE L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR LES LYSOPHOSPHATIDES.

A - ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LE POUVOIR HEMOLYTIQUE DE LA LYSOLECITHINE.

Après avoir vérifié que l'alcool absolu employé comme solvant de la lysolécithine et des acides gras, ne provoquait pas d'hémolyse à la concentration au 1/50ème et aux différentes températures d'expérience, on détermine les cinétiques d'hémolyse, à la température de + 4°C, à différentes concentrations (fig. 62) pour déterminer la zone de travail.

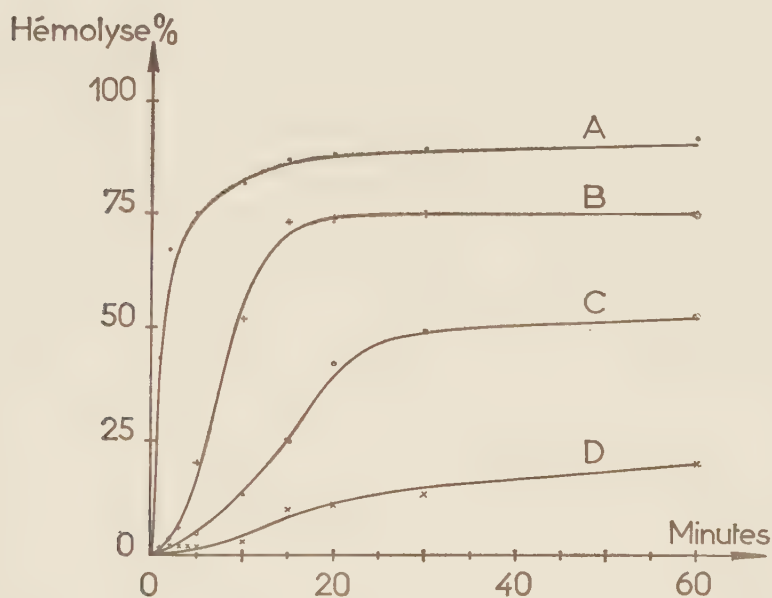


FIG. 62 - Pourcentage d'hémolyse en fonction du temps, pour différentes concentrations de lysolécithine,

A, $\frac{1}{160\ 000}$ B, $\frac{1}{200\ 000}$ C, $\frac{1}{240\ 000}$ D, $\frac{1}{300\ 000}$.

Dans les conditions de l'expérience, l'hémolyse est totale et quasi instantanée pour une solution de lysolécithine au I/100 000ème. On choisit la concentration au I/200 000ème. Huit lots de cette solution alcoolique de lysolécithine sont mis en incubation pendant trente minutes, aux températures respectives de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, et 90°C. Après refroidissement dans un bain glacé, on effectue, pour chaque lot, une cinétique de l'hémolyse à + 4°C. Dans tous les cas, on retrouve une courbe d'aspect sigmoïde, identique au produit qui était resté à la température de + 4°C.

La température n'a donc aucune action sur le pouvoir hémolytique de la lysolécithine.

Si on étudie maintenant l'action hémolytique de ce lysophosphatide à des concentrations variant du I/20 000ème au I/320 000ème, et pour les températures de + 4°C, 15°C, 25°C et 37°C, on observe une hémolyse d'autant plus forte que la température est plus basse (fig. 63) conformément aux observations de Collier (259).

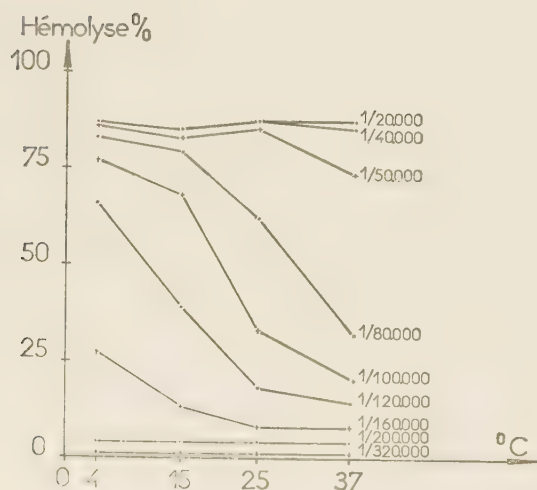


FIG. 63 - Action de la température sur le degré d'hémolyse, pour des concentrations différentes de lysolécithine.

Enfin, les basses températures, après congélation suivie de décongélation de solution de lysolécithine dans le liquide allantoïque non infecté, ne provoquent aucune variation dans le degré de l'hémolyse, comme le montre le tableau XXI.

Températures	+ 4°C (témoin)	- 10°C	- 30°C	- 70°C
% HL	25 %	28 %	24 %	26 %

Tableau XXI - Pourcentage d'hémolyse d'une solution de lysolécithine pour des températures de congélation différentes.

B - HEMOLYSE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN LYSOLECITHINE.

On met en contact, à la température de + 4°C, et pendant un temps de 15 mn, des dilutions croissantes de lysolécithine, variant de 1/320 000 à 1/200 000, avec une suspension d'hématies 0 Rh+, dans le rapport 1/10. Après centrifugation pendant quelques minutes, la densité optique du surnageant est traduite en pourcentage d'hémolyse par rapport à l'hémolyse totale.

La même expérience est répétée à la température de + 37°C.

Dans les deux cas, la courbe a un aspect sigmoïdal (fig. 64).

C - ACTION DE LA TRYPSINE SUR LA LYSOLECITHINE.

On met en présence, à la température de + 37°C, 4,5 ml d'une solution tamponnée de Cox, avec 0,5 ml d'une solution de lysolécithine dont la dilution est calculée pour donner une hémolyse caractéristique, inférieure à 100 %. Après des temps d'incubation variables, on prélève

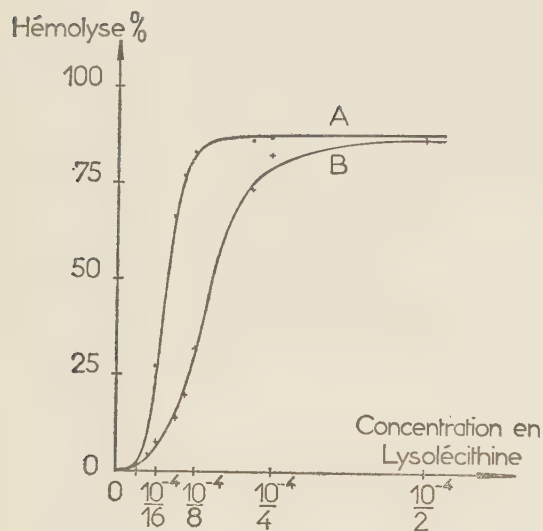


FIG. 64 - Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration en lysolécithine, A, à la température de + 4°C, B, à la température de + 37°C.

0,9 ml du mélange que l'on met en contact avec 0,1 ml d'une solution de diisopropylfluorophosphate au 1/50ème dans l'alcool isopropylique pour bloquer l'action de la trypsine, comme nous le verrons dans le chapitre troisième, deuxième partie, puis on effectue une réaction d'hémolyse. Le tableau XXII montre que la trypsine n'a aucune action sur le pouvoir hémolytique de la lysolécithine.

Temps en minutes	5	10	20	30	60	Témoin alcool	Témoin lyso.
HL %	71	72	71	71	71	0	73

Tableau XXII - Action de la trypsine sur le pouvoir hémolytique de la lysolécithine, pour des temps d'incubation variables.

D - ACTION DE L'ETHER DEPEROXYDE SUR LA LYSOLECITHINE.

Si on fait barboter à reflux, de l'éther déperoxydé à l'ébullition

dans un appareil de Soxhlet contenant un mélange de liquide allantolique non infecté et une solution de lysolécithine dont la dilution finale produit une hémolyse caractéristique et inférieure à 100 %, on retrouve, après 2 h de ce traitement et évaporation de l'éther sous courant d'air comprimé, le même titre hémolytique qu'au début de l'expérience (tableau XXIII).

A	Lysolécithine en solution alcoolique	% HL à 4°C	68
		% HL à 37°C	17
T	Ether déperoxydé + alcool absolu	% HL à 4°C	7
		% HL à 37°C	10
B	Ether déperoxydé + LL dans l'alcool absolu	% HL à 4°C	66
		% HL à 37°C	19

Tableau XXIII - Pourcentage d'hémolyse obtenu par la lysolécithine (LL) avant (A) et après (B) contact avec l'éther à ébullition.

E - HEMOLYSE COMPAREE DES HEMATIES HUMAINES ET DES HEMATIES DE MOUTON PAR LA LYSOLECITHINE.

Si on examine comparativement (tableau XXIV) les cinétiques d'hémolyse des hématies humaines et des hématies de mouton par la lysolécithine à la dilution finale de 1/160 000, à la température de + 37°C, on observe des résultats quasi identiques.

A la température de + 4°C, l'hémolyse est plus forte dans les deux cas (tableau XXV).

Temps en minutes		5	10	15	20	30	45	60
% HL	GR O Rh +	6	10	10	11	11	14	14
	GR Mouton	6	10	10	12	12	14	15

Tableau XXIV - Hémolyse comparée des hématies humaines O Rh+ et des hématies de mouton par la lysolécithine, à la température de + 37°C.

Temps en minutes		5	10	15	20	30	45	60
% HL	GR O Rh+	80	85	86	87	87	87	87
	GR Mouton	32	55	85	85	85	85	85

Tableau XXV - Hémolyse comparée entre les hématies humaines O Rh + et les hématies de mouton par la lysolécithine, à la température de + 4°C.

F - INHIBITION DE L'HEMOLYSE DUE A LA LYSOLECITHINE PAR L'OVOLECITHINE.

On fait agir de l'ovolécithine purifiée à une concentration variant de 1/5 000 à 1/25 000 sur une quantité constante de lysolécithine pure, utilisée à la concentration finale au 1/160 000ème. Après trente minutes d'incubation à la température de + 4°C du mélange constitué par 0,1 ml de lysolécithine, 4,5 ml de solution à concentration croissante d'ovolécithine, 4,5 ml de suspension de GR O Rh+ à 1%, on obtient les résultats suivants (tableau XXVI). Le degré d'hémolyse est d'autant plus faible que la concentration d'ovolécithine est plus élevée.

Concentration en ovolécithine	I/25 000	I/20 000	I/16 000	I/12 500	I/7 500	I/5 000
% HL	64	56	38	37	25	26

Tableau XXVI - Action inhibitrice de l'ovolécithine sur l'hémolyse provoquée par la lysolécithine.

G - ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LE POUVOIR HEMOLYTIQUE DES ACIDES GRAS.

A l'aide des méthodes précédemment décrites, on établit dans un premier temps, les cinétiques d'hémolyse par les acides gras aux températures de + 37°C et de + 4°C, ce qui permet de déterminer la dilution optimale pour la suite des expériences. Le tableau XXVII montre que l'hémolyse est plus intense à la température de + 37°C qu'à celle de + 4°C. Les courbes représentatives des cinétiques ont un aspect sigmoïdal.

Temps en minutes		I	2	3	4	5	10	15	20	30	60
I/20 000	+4°	84	85	86		90		95		100	100
	+37°	100				100					100
I/40 000	+4°	4	4	4	5	5	5	12	18	28	32
	+37°	100				100					100
I/80 000	+4°	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+37°	8	9	10	10	13	25	29	33	68	96

Tableau XXVII - Pourcentage d'hémolyse en fonction du temps, pour des concentrations différentes d'acide gras, aux températures de +4°C et +37°C.

Dans un second temps, lorsqu'on soumet ces acides gras, obtenus par l'action de la lécithinase A du venin de cobra sur l'ovolécithine, à des températures variant entre $+40^{\circ}\text{C}$ et $+90^{\circ}\text{C}$, on n'observe que peu de modification dans leur pouvoir hémolytique. Après 30 minutes à la température de $+90^{\circ}\text{C}$, ces acides gras sont toujours hémolytiques, à la dilution d'expérience au 1/50 000ème (fig. 65).

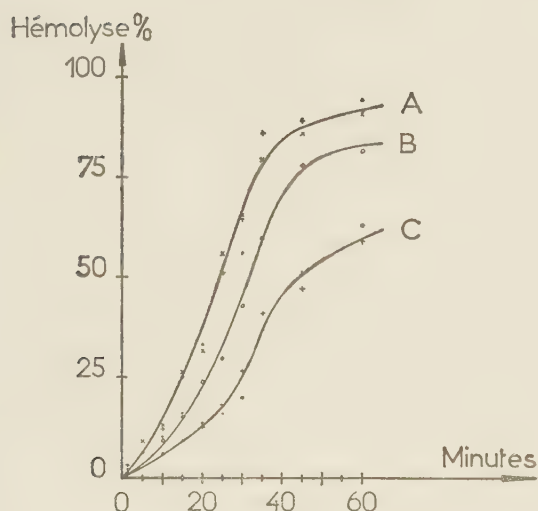


FIG. 65 - Influence de la température en fonction du temps, sur le pouvoir hémolytique des acides gras.

A, $+40^{\circ}\text{C}$, $+50^{\circ}\text{C}$, $+60^{\circ}\text{C}$,

B, $+70^{\circ}\text{C}$,

C, $+80^{\circ}\text{C}$, $+90^{\circ}\text{C}$.

H - CINÉTIQUE D'HEMOLYSE PAR LE MÉLANGE LECITHINE, LYSOLECITHINE ET ACIDES GRAS.

Pour essayer de retrouver les cinétiques de type exponentiel, mises en évidence avec Myxovirus parainfluenzae I, on établit la courbe d'hémolyse en fonction d'un mélange de phosphatides, acides gras et lysophosphatides, c'est-à-dire dans les conditions de l'infection virale, si l'hypothèse de la présence de lysolécithine est exacte. Après 30 mn d'incubation, on retrouve l'allure sigmoïdale de la courbe de la figure 64 (fig. 66), mais les concentrations nécessaires sont environ dix fois plus fortes, ce qui confirme l'action protectrice de l'ovolécithine sur l'hématie.

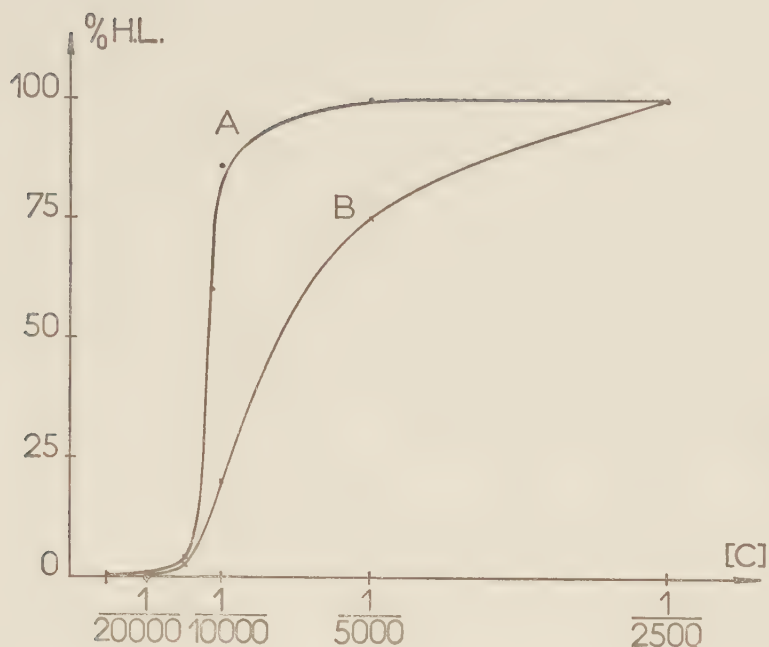


FIG. 66 - Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration d'un mélange de lécithine, acides gras, lysolécithine pour des températures de réaction de + 4°C (A) et de + 37°C (B).

Les cinétiques obtenues avec ce même mélange, à la concentration finale au 1/10 000ème, en fonction de concentrations variables d'hématies humaines 0 Rh+ sont également très différentes de celles présentées par Myxovirus parainfluenzae I. On observe une lyse quasi-immédiate avec les suspensions à 0,25, 0,50 et 1 p. 100 tandis que les courbes d'hémolyse pour des concentrations plus élevées sont d'aspect sigmoïdal (fig. 67).

I - ESSAI D'ADSORPTION DE LA LYSOLECITHINE, DE LA LECITHINE, DES ACIDES GRAS SUR LE VIRUS SENDAI.

Les Myxovirus s'adsorbent plus ou moins fortement à certains lipides tels que le cholestérol en poudre, les acides palmitique et stéa-

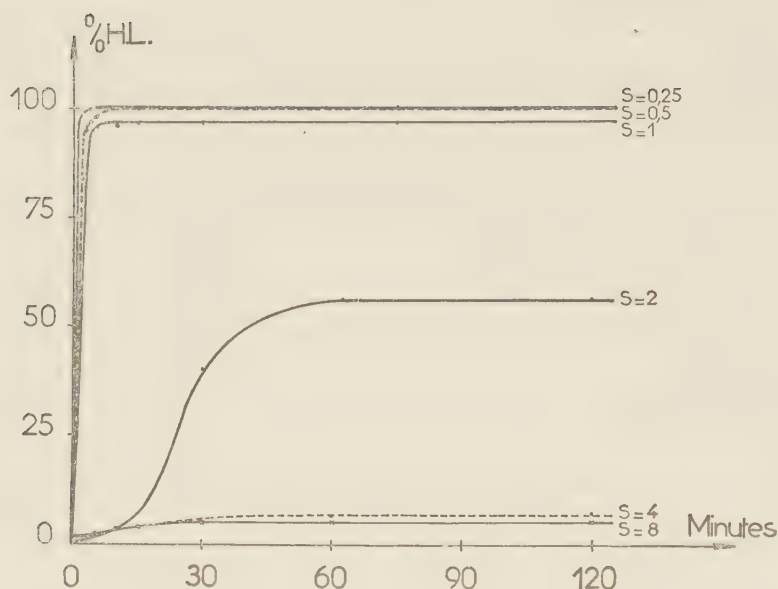


FIG. 67 - Pourcentage d'hémolyse en fonction du temps, par un mélange de lécithine, acides gras et lysolécithine, pour des concentrations variables d'hématies,

de $S = 8 \%$ à $S = 0,25 \%$

rique, comme l'ont montré Woodhovr et Jensen (290) et cette propriété a été utilisée par Youngner et Noll (291), puis par Noll et Youngner (292), pour différencier entre eux les virus lipophiles.

Myxovirus parainfluenzae I, cultivé sur cellule KB, n'étant pas hémolytique, on pouvait penser, en admettant l'hypothèse d'un lysophosphatide responsable du pouvoir hémolytique, que ce virus deviendrait hémolytique après contact in vitro avec la lysolécithine ou les acides gras qui proviennent de la dégradation de l'ovolécithine.

On laisse en contact, sous agitation et pendant vingt-quatre heures, aux températures de $+ 37^{\circ}\text{C}$ et de $+ 4^{\circ}\text{C}$, 0,5 ml de solution de lécithine au

I/40 ème et 4,5 ml de suspension virale non hémolytique *. On centrifuge à 50 000 g pendant 2 h. On recherche le pouvoir hémolytique à la température de + 37°C sur le culot repris par le volume initial du tampon de Cox (92) et sur le surnageant.

On répète l'expérience avec une solution de lysolécithine au I/100ème et avec une solution d'acides gras à la même concentration. Le tableau XXVIII confirme que la lécithine n'est pas hémolytique et qu'il n'y a pas eu d'adsorption de la lysolécithine sur la particule virale. L'hémolyse par les acides gras du culot est due à leur insolubilité en milieux aqueux.

		Lécithine		Lysolécithine		Acides gras	
		culot	surnageant	culot	surnageant	culot	surnageant
HL %	37°C	0	0	I	91	96	100
	4°C	I	0	I	84	86	86

Tableau XXVIII - Pourcentage d'hémolyse des culots et surnageants de centrifugation des mélanges respectifs Lécithine, Lysolécithine, Acides gras - virus non hémolytique, après vingt-quatre heures de contact aux températures de + 37°C et de + 4°C.

IV - RECHERCHE DE LA LYSOLECITHINE DANS LES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I.

Neuf cents millilitres de liquide allantoïque infecté sont répartis en trois lots égaux. Le premier lot (A) est conservé à la température

* Myxovirus parainfluenzae I provenant de culture sur cellules KB.

de + 4°C, le second (B) est soumis à une série de congélations à - 30°C, suivies de décongélations à + 37°C pour élever le titre hémolytique, tandis que le troisième lot (C) est conservé à la température de - 10°C pendant un temps suffisamment long pour abaisser le titre hémolytique, comme nous le verrons dans un prochain chapitre. Chaque lot est fractionné en deux parties égales ; la première est purifiée par précipitation méthanolique (I) suivie d'une centrifugation différentielle ; la seconde, qui suit un processus voisin du point de vue technique, remplace le méthanol par la solution tamponnée (2) de Cox (92). Les résultats, du point de vue hémagglutination et hémolytique sont donnés dans le tableau XXIX.

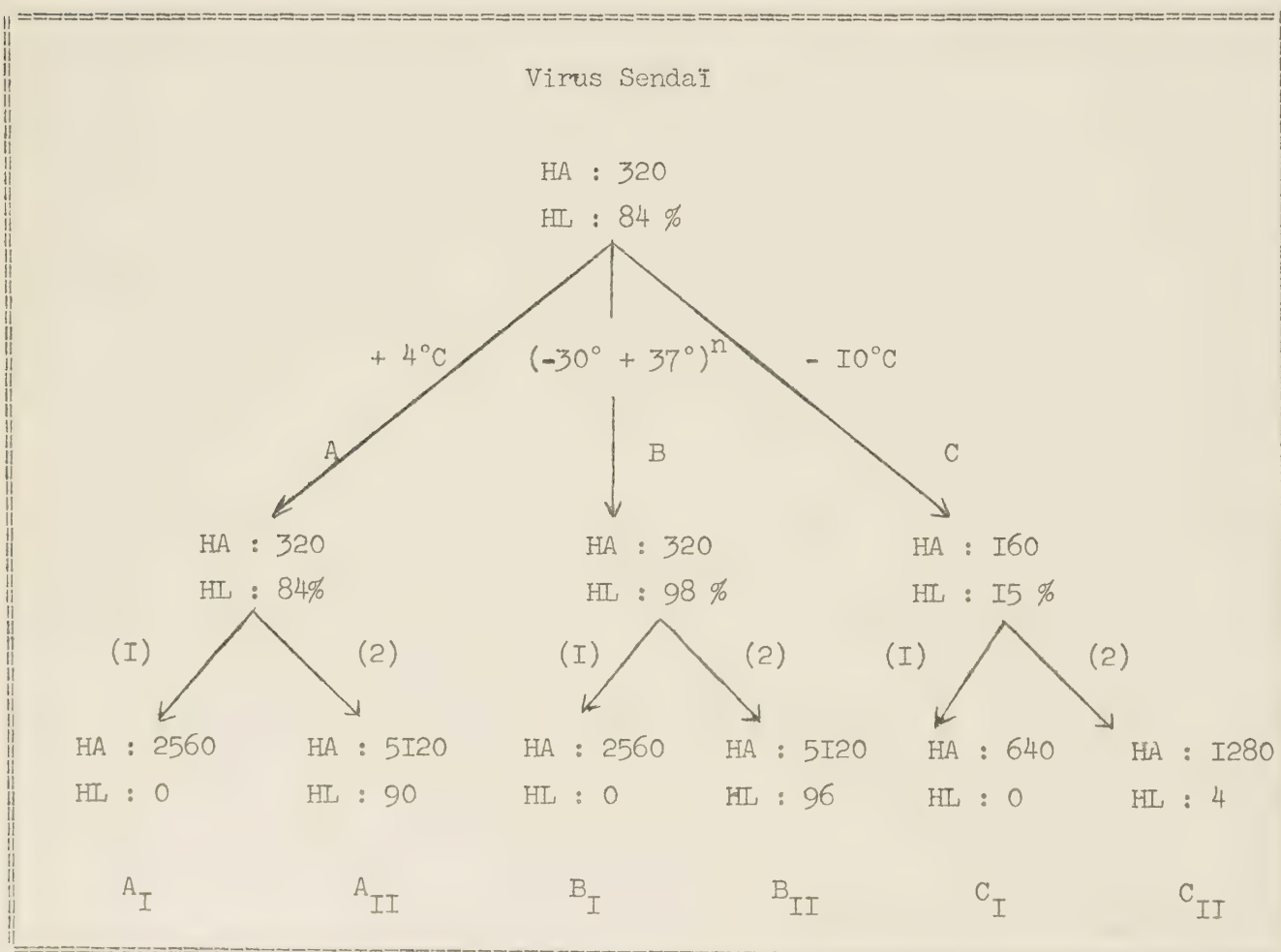


Tableau XXIX - Evolution des titres hémagglutinant et hémolytique après diverses méthodes de purification du virus grippal.

Les lipides de chaque fraction sont extraits et purifiés par le mélange chloroforme-méthanol 2 : 1 (v/v), suivant la technique de Folch, Lees et Standley (283). Dans certains cas, afin d'éviter la dégradation des acétal phosphatides présents dans le matériel étudié en lysophosphatides hémolytiques, l'extraction a été réalisée, comme le conseille Thiele (284), à l'aide de solvants non polaires ou peu polaires (chloroforme, tétrachlorure de carbone, benzène).

La séparation des lipides est ensuite effectuée par chromatographie sur colonne de silice selon la méthode de Lea, Rhodes et Stoll (286), les phosphatides étant élués à l'aide de concentrations croissantes de méthanol dans le chloroforme, comme nous l'avons montré au début de ce chapitre.

Chaque fraction est séchée sous courant d'azote, pesée, et son identification est contrôlée par chromatographie en couche mince et par microspectrographie infrarouge. Les substances hémolytiques sont mises en évidence par l'épreuve au subtosan, ou par la méthode directe.

La recherche de la lysolécithine a toujours été négative, comme l'indique le tableau XXX. En revanche, les substances hémolytiques ont été identifiées comme étant des acides gras. On remarquera, que dans le seul cas où la fraction III est hémolytique (C_2), le contrôle par chromatographie en couche mince nous montre la présence d'acides gras, ce qui indique une mauvaise séparation sur colonne de chromatographie et par conséquent, peut être la source d'erreurs importantes lorsque le contrôle n'est pas effectué de manière systématique.

V - DISCUSSION

Le pouvoir hémolytique de la lysolécithine, (Robinson (293)), isolée de l'ovolécithine par action de la lécithine du venin de serpent

résiste à des températures élevées, n'est pas modifié par la congélation et ne subit aucune variation sous l'influence de la trypsine ou de l'éther déperoxydé. Les courbes représentatives des cinétiques d'hémolyse de la lysolécithine sont des sigmoïdes, pour lesquelles la phase d'amorçage de la lyse est d'autant plus grande que la concentration est plus faible. Le pourcentage d'hémolyse est toujours plus élevé à la température de + 4°C qu'à celle de + 37°C, contrairement à l'hémolyse provoquée par les acides gras.

Ces propriétés ne sont pas en faveur de l'identité entre les lysophosphatides, les plasmalogènes (Gottfried et Rapport (294, 295)) et l'hémolysine, mais on pouvait supposer que des quantités importantes d'ovolé-cithine ou de cholestérol présentes dans la cellule, neutralisaient totalement ou en partie l'action lytique des lysophosphatides.

Malgré nos efforts, il ne nous a pas été possible de les caractériser ni par chromatographie en couche mince, ni par une nouvelle technique de microspectrographie infrarouge.

La présence d'acides gras hémolytiques, au cours de l'extraction des lipides sur colonne de chromatographie de plusieurs lots de virus conservés et purifiés par des méthodes différentes ne peut être qu'un artefact de préparation dû à leur isolement, car les cinétiques qui leurs sont propres sont très différentes de celles données par l'hémolysine virale.

Une autre cause d'erreur pourrait provenir d'élutions insuffisantes, de telle manière, par exemple, qu'un reliquat de lecithine resté sur la colonne après passage du solvant III, se dégrade par hydrolyse, à la température du laboratoire, libérant un acide gras et des traces de lysophosphatides très hémolytiques (Fontanges, Coeur, Deniel et Colobert (296)).

Les méthodes d'étude des lipides sont multiples et les résultats ne sont pas toujours superposables. Ainsi, Frommhagen, Knight et Freeman (297)

	Fractions	% HL		Chromatographie en couche mince
		méthode directe	méthode au subtosan	
A _I	I	0	0	neutres
	II	0	0	céphaline
	III	0	0	lécithine + Sphingomyéline
	IV	0	0	0
A ₂	I	0	7	neutres + A.gras
	II	0	0	céphaline
	III	0	0	lécithine + Sphingomyéline
	IV	0	0	Sphingomyéline
B _I	I	0	21	neutres + traces A. gras
	II	0	0	céphaline
	III	0	0	lécithine + Sphingomyéline
	IV	0	0	Sphingomyéline
B ₂	I	0	28	neutres + A. gras
	II	0	0	céphaline + lecithine
	III	0	0	L. + Sphingomyéline
	IV	0	0	Sphingomyéline
C _I	I	0	4	Neutres
	II	0	0	Céphaline + neutres
	III	0	0	L. + Sphingomyéline
	IV	0	0	0
C ₂	I	0	75	Neutres + A. gras
	II	0	0	0
	III	15	32	A. gras + Céphaline + L.+Sp
	IV	0	0	0
Colonne placebo	I	0	0	0
	II	0	0	0
	III	0	0	0
	IV	0	0	0

Tableau XXX - Degré d'hémolyse et identification par chromatographie en couche mince des fractions lipidiques extraites de lots de virus purifiés par des méthodes différentes (v. tableau XXVIII).

montrent que les rapports phospholipides/cholestérol/triglycérides sont très voisins dans le cas de trois Myxovirus en utilisant la technique de séparation sur colonne d'acide silicique, alors que Armbruster et Beiss (298) trouvent des rapports très différents les uns des autres en effectuant la séparation des constituants par chromatographie sur papier silicé.

Les dégradations sur colonne ou sous l'action de certains solvants, la non-spécificité de l'épreuve hémolytique, expliquent la discordance des résultats, mais en se plaçant dans les conditions les plus rigoureuses avec contrôle de chaque étape par chromatographie en couche mince et microspectrographie infrarouge, il ne semble pas que l'on puisse retenir l'hypothèse d'un lysophosphatide comme facteur responsable de l'hémolyse virale.

Pour Neurath (299), les préparations purifiées des virus Sendaï et de la maladie de Newcastle présenteraient une activité diisophosphorylfluorophosphatasique ce qui permet de supposer que l'hémolysine est une estérase. L'injection de désoxycholate de soude, de vitamine A, d'histamine à des embryons de poulet, 16 heures après l'infection virale montre une augmentation notable des hydrolases lysosomiques et, parallèlement, une activité hémolytique très élevée. Réciproquement, une injection d'hydrocortisone abaisse la quantité d'hydrolases et le degré d'hémolyse. L'hypothèse d'une β -naphtylestérase ou d'une aminopeptidase, isolée dans le culot de centrifugation serait donc à considérer.

Pour Stickl (300), le traitement des cellules chorioallantoïques des embryons de poulet par le virus des oreillons, conduisant à la production de substances non dialysables, de poids moléculaire élevé et douées d'une activité hémolytique même en l'absence de particules entières permet de poser l'hypothèse d'enzymes protéolytiques responsables de cette propriété.

Devant l'incertitude qui enveloppe le support de l'activité hémolytique et l'abandon d'une origine lysophosphatidique, il nous a paru ju-

dicieux de tenter son isolement par un procédé physique tel que la centrifugation en gradient de densité.

CHAPITRE DEUXIEME

RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE LES CARACTERES HEMOLYTIQUE ET HEMAGGLUTINANT DE M. PARAINFLUENZAE I PAR LA CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE

La centrifugation en gradient de densité a surtout été utilisée pour séparer les virus de leurs impuretés protéiniques puisque la taille, la forme, la densité des particules, la viscosité du milieu sont autant de facteurs déterminant l'équilibre de la sédimentation. Ainsi, Zwartow, Westwood et Appleyard (301) purifièrent le virus vaccinal par cette méthode, en le séparant de ses contaminants tissulaires.

Cet équilibre a été réalisé en gradient de chlorure de caesium notamment par Szybalski (302) pour séparer des macromolécules de taille différente, par Barry (303) pour mettre en évidence le virus grippal incomplet, moins dense, par rapport au virus standard et par Stenback et Durand (304) pour rechercher l'influence de la cellule-hôte sur la constitution du virus de la maladie de Newcastle.

Crawford (305) montra en plus, l'hétérogénéité des particules virales du sarcome de Rous et de la maladie de Newcastle en gradient de chlorure de rubidium.

Les premiers essais de fractionnement d'un virus hémolytique ont été réalisés par Schluederberg (306) en 1962, avec le virus de la rougeole soumis à un équilibre de sédimentation en chlorure de caesium, suivant la technique de Meselson, Stahl et Vinograd (307). Si cette méthode permettait d'identifier des particules plus légères possédant à la fois les caractères

hémagglutinant et hémolytique, en revanche, elle était incapable de les séparer entre elles.

Sokol (308) a confirmé ces résultats avec une suspension de virus de la maladie de Newcastle déposée sur un gradient de saccharose, suivant la technique de Martin et Ames (309), mise au point quelques années auparavant pour séparer les macromolécules de poids moléculaire peu élevé - lysosymes, catalases, alcool-deshydrogénases - de mélanges protéiniques.

Mac Crea, Epstein et Barry (310) ont préféré utiliser des gradients de tartrate de potassium pour éviter l'inactivation des propriétés virales par les sels de rubidium ou de caesium tandis que Orosian, Rizvi et Mora (311) ont recommandé le polyglucose synthétique.

La méthode en gradient de saccharose a été étendue à différents virus grippaux par Neurath et Sokol (312) qui localisent une adénosine diphosphatase dans le pic de sédimentation des particules virales, soulevant l'hypothèse du rôle possible de cet enzyme dans le phénomène hémolytique.

Enfin, l'application de cette technique à Myxovirus parainfluenzae I par Neurath (313), en gradient de saccharose 10-50 %, n'a pas permis de distinguer l'hémagglutinine de l'hémolysine.

Nous avons utilisé la méthode de centrifugation en gradient de saccharose, d'une part avec des particules complètes ou broyées de Myxovirus parainfluenzae I cultivées soit sur oeufs embryonnés soit sur cellules K B, d'autre part avec des particules virales libérées des cellules des membranes chorio-allantoïques par le desoxycholate de soude, pour suivre les propriétés hémagglutinante et hémolytique au cours du gradient de centrifugation et rechercher s'il existe une relation entre leurs molécules supports.

I - MATERIEL ET METHODES

Dans une première série d'expériences, on part d'un lot de 200 ml de Myxovirus parainfluenzae I purifié par centrifugation différentielle et dont on a élevé le titre hémolytique par une série de congélations - décongélations.

Parallèlement, on prépare un gradient linéaire de saccharose (5 à 20 %) en tampon acétate 0,01 M pH 5,0 , Na Cl 0,1 M, Mg 0,01 M , suivant la technique de Britten et Roberts (314).

On dépose 2 ml de la suspension virale sur le gradient de saccharose puis on centrifuge à 25 000 tours/ minute, à l'aide du rotor SW 25 d'une ultracentrifugeuse Spinco modèle L. Après trois heures de centrifugation on retire délicatement le tube que l'on perce à sa partie inférieure. on recueille des fractions aliquotes de X gouttes, sur lesquelles on recherche les titres hémagglutinant et hémolytique.

Des essais préliminaires de titrages de ces propriétés, en présence de saccharose à 5 p.100 et à 20 p.100 sont effectués avec des concentrations croissantes de virus. L'influence du saccharose est négligeable, comme le montre la figure 68, où, pour les deux concentrations extrêmes, on retrouve le même titre hémagglutinant et des cinétiques d'hémolyse très voisines. En revanche, on ne peut rechercher l'activité neuraminidasique car l'oxydation périodique à forte température, suivant la méthode de Warren (65), produit une caramélisation qui empêche toute lecture au photomètre.

Dans une autre série d'expériences, on soumet la suspension virale à un broyage mécanique à l'aide de billes de verre de 0,11 à 0,12 mm de diamètre, pendant trois minutes, à la vitesse I d'un broyeur Braun * refroidi

* Broyeur Braun B. - Apparatebau - Melsungen - Allemagne.

par détente de gaz carbonique. Après centrifugation à 6000 g pendant quinze minutes pour éliminer les billes de verre, on recueille le surnageant que l'on dépose sur le gradient de saccharose pour le soumettre ensuite aux mêmes conditions de sédimentation que précédemment.

Dans une troisième série d'expériences, on part d'une suspension virale cultivée sur cellules K B de la manière suivante.

Sur un tapis de cellules ,repiqué depuis 24 h. en boîtes de Roux, on verse 5 ml d'une suspension de Myxovirus parainfluenzae I dont le titre est calculé conformément aux travaux de Demont, Berkaloff et Colobert (315) afin d'obtenir un inoculum de 0,01 DI_{50} par cellule pour l'embryon de poulet. On laisse en contact pendant 36 minutes avant de recouvrir le tapis cellulaire par 80 ml de milieu nutritif constitué par la solution saline de Hanks additionnée de 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine * de 1 p. 100 d'extrait de levure, de 10 p. 100 de sérum de poulain et, par ml, de 250 unités de pénicilline et de 50 μ g de streptomycine.

Après cinq jours d'incubation à la température de + 37° C, on effectue une première trypsination, à l'aide d'une solution de trypsine à 0,5 p. 100 , puis une seconde trypsination, le lendemain, au sixième jour. On observe alors, dans les vingt-quatre heures qui suivent ce deuxième traitement, l'apparition d'une réaction cytopathogène avec production d'une quantité importante de virus infectieux titré sur embryon de poulet.

Immédiatement après la seconde trypsination, 2.10^7 cellules par boîte de Roux sont remises en suspension dans 50 ml de milieu neuf contenant 4 μ M d'uracile et 2 μ C de (2 - I^4 C) - uracile, d'activité spécifique 10,2 mC/ μ M (activité spécifique totale 0,47 μ C/ μ M).

Les cellules sont centrifugées à partir des flacons trypsinés, à 1500 tours par minute, puis broyées à froid, pendant trois minutes avec des billes de verre de diamètre moyen 1,00 mm - 1,05 mm. Après centrifu-

* Lactalbumine Hydrolysate, Enzymatic, Nutritional Biochemicals Co .

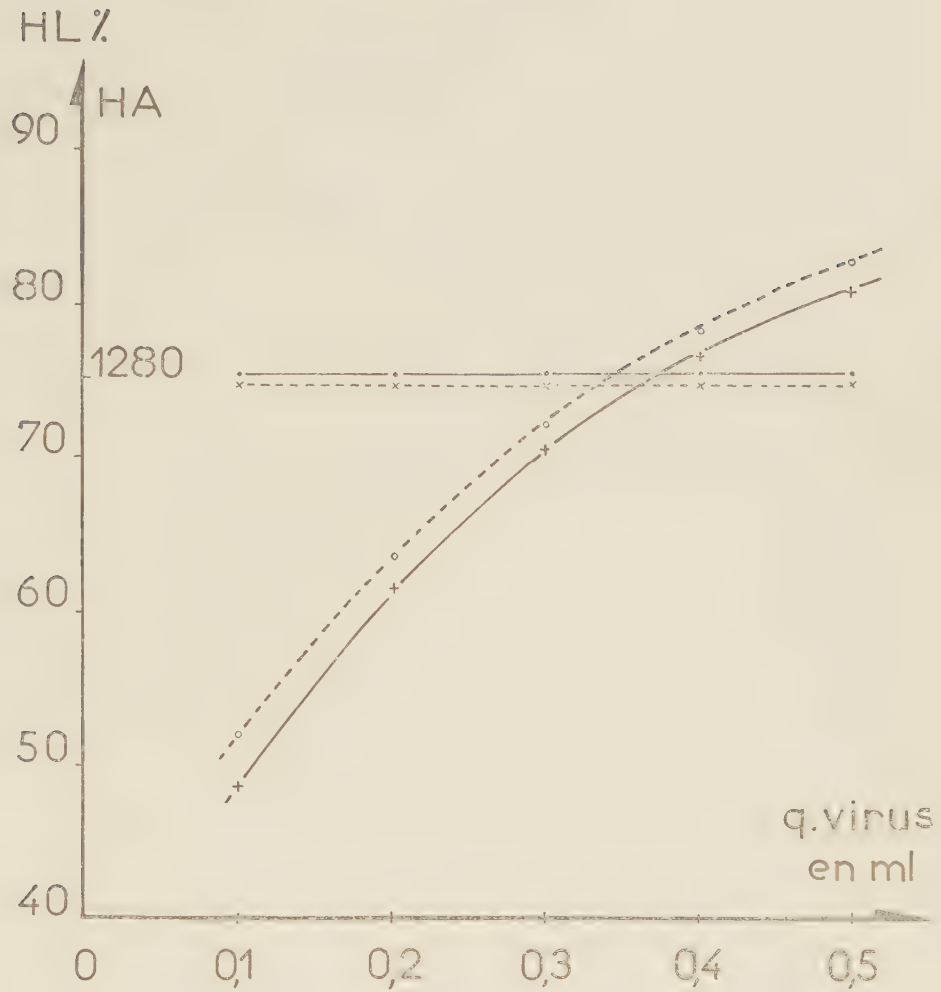


FIG. 68 - Titre hémagglutinant (HA) et pourcentage d'hémolyse (HL) en fonction de la concentration de Myxovirus parainfluenzae I dans le saccharose à 5 p. 100

HA .———., HL +———+

et dans le saccharose à 20 p. 100

HA x-----x , HL o-----o .

gation différentielle qui élimine les débris cellulaires, on titre le surnageant contenant les particules virales. Malgré de grandes quantités de produit utilisé, on ne retrouve jamais l'activité hémolytique, comme l'avaient constaté Matsumoto et Maeno (316) après culture du virus Sendai sur cellules de poumon de souris; Ishida et Homma (317, 318) puis Homma (319) sur cellules L de fibroblastes de souris et Hosaka (320) sur cellules de rein de porc.

La suspension virale est centrifugée en gradient de saccharose et chaque fraction aliquote est titrée du point de vue hémagglutinant tandis que leur radioactivité est mesurée à l'aide d'un détecteur TGC I4 Tracerlab *.

Enfin, dans une dernière série d'expériences, on part de soixante membranes chorio-allantoïques récoltées stérilement et provenant pour la première moitié, d'oeuf* embryonnés inoculés avec Myxovirus parainfluenzae I et, pour la seconde moitié, d'oeufs non inoculés. Ces membranes sont lavées dans une solution isotonique de chlorure de sodium à 5000 g pendant 15 minutes, puis traitées à la température de + 37° C par une solution de desoxycholate de soude à la concentration finale de 0,25 p. 100. Cette valeur correspond, comme nous le verrons dans un prochain chapitre, à une concentration qui détruit l'activité hémolytique et conserve la propriété hémagglutinante d'une suspension virale tout en ne présentant aucun caractère d'hémolyse propre.

Après trente minutes d'incubation sous agitation, on centrifuge à 100 000 g pendant trois heures, puis on reprend le culot par 3 ml de la solution tamponnée qui sert à préparer le gradient de saccharose, avant de le centrifuger dans les conditions habituelles de gradient. Pour chaque fraction aliquote, on recherche les titres hémagglutinant et hémolyse

* Tracerlab. 1601 Trapelo Road, Waltham 54, Massachussetts U.S.A.

lytique. Une expérience parallèle est effectuée en traitant les membranes par le desoxycholate de soude à la température de 0°C au lieu de + 37°C.

II - RESULTATS

A - CENTRIFUGATION DES PARTICULES COMPLETES PROVENANT D'UNE CULTURE SUR OEUFS EMBRYONNES.



FIG. 69 - Répartition des activités hémagglutinante (.——.) et hémolytique (x-----x) au cours d'une centrifugation de Myxovirus parainfluenzae I, en gradient de densité de saccharose 5-20 %,

HA, en unités Hirst par ml,

HL, en pourcentage d'hémolyse.

La figure 69 montre la répartition des activités hémagglutinante et hémolytique pour une suspension virale purifiée par centrifugation différentielle et dont le titre hémagglutinant est de 40 960 unités Hirst par ml. Le titre hémolytique de cette suspension, calculé en pourcentage d'hémolyse par la méthode décrite dans notre chapitre septième, première partie, mais en diluant le prélèvement dans le rapport de concentration est de 51.

L'étude de ces courbes montre un certain parallélisme entre les deux activités recherchées et met en évidence deux pics caractéristiques le premier, situé dans les fractions de tête, correspond aux particules de forte densité, le second, qui provient de l'analyse des 29ème et 30ème fraction, contient les particules qui n'ont pas sédimenté après trois heures de centrifugation à 28 000 tours/minute.

B - CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DES PARTICULES VIRALES PREALABLEMENT BROYEES.

Un lot de virus Sendai, purifié par centrifugation différentielle et titrant 10 240 unités Hirst par ml est réparti en deux fractions de volume égal. La première est centrifugée directement en gradient de saccharose 5-20 p.100 et sert de témoin. La seconde fraction subit un broyage aux billes de verre pendant trois minutes avant d'être centrifugée dans des conditions analogues.

La recherche des activités hémagglutinante et hémolytique met en évidence la présence de deux pics dans la fraction témoin (fig. 70 - A et A') le premier situé de part et d'autre du 9ème prélèvement et le second terminal, alors qu'après broyage, on observe une majorité de petites particules qui n'ont pas sédimenté après trois heures à 28 000 tours/minute (fig. 70 -B et B'). Dans tous les cas, il y a superposition des activités hémagglutinante et hémolytique.

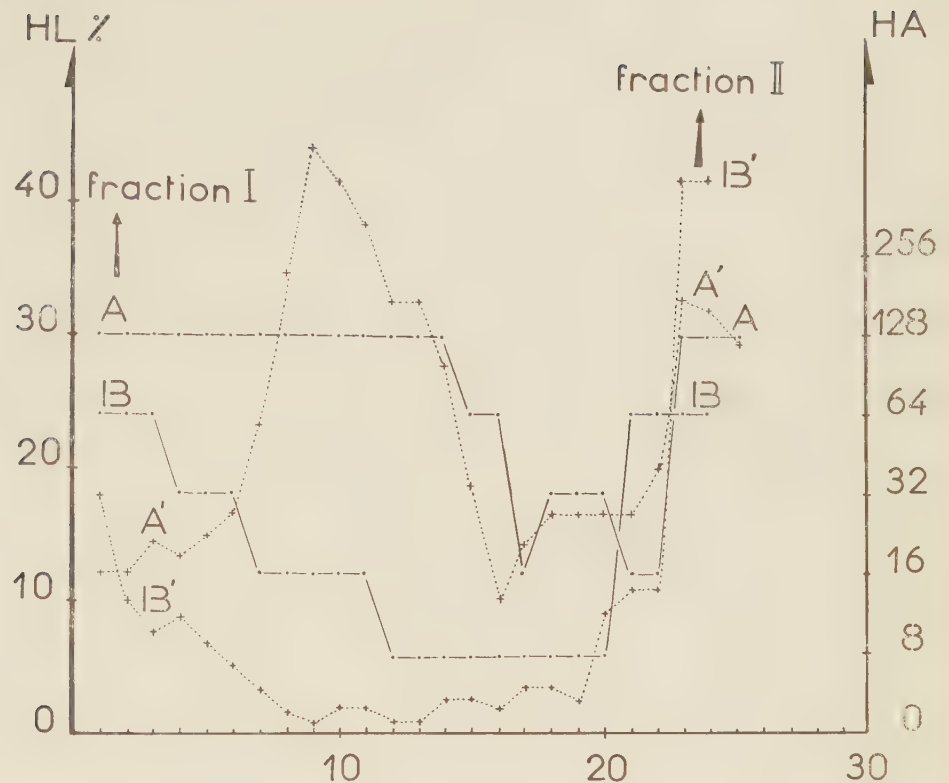


FIG. 70 - Répartition des activités hémagglutinante (—) et hémolytique (x-----x) au cours d'une centrifugation de Myxovirus parainfluenzae I en gradient de densité de saccharose, avant (courbes A et A') et après broyage (courbes B et B'),

HA, en unités Hirst,

HL, en pourcentage d'hémolyse.

C - CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DES PARTICULES VIRALES PREALABLEMENT SOUMISES A UNE SERIE DE CONGELATIONS - DECONGELATIONS.

Devant l'impossibilité de séparer les activités hémagglutinante et hémolytique dans le surnageant, dans les conditions d'expérience préci-

tées, on utilise cette fois un gradient linéaire de saccharose 1-10 p.100 et un temps d'ultracentrifugation de quatorze heures, sous vide de 10 microns. La figure 71 montre le déplacement strictement superposable des propriétés hémagglutinante et hémolytique dans la région 6-8 p.100 de concentration en saccharose.

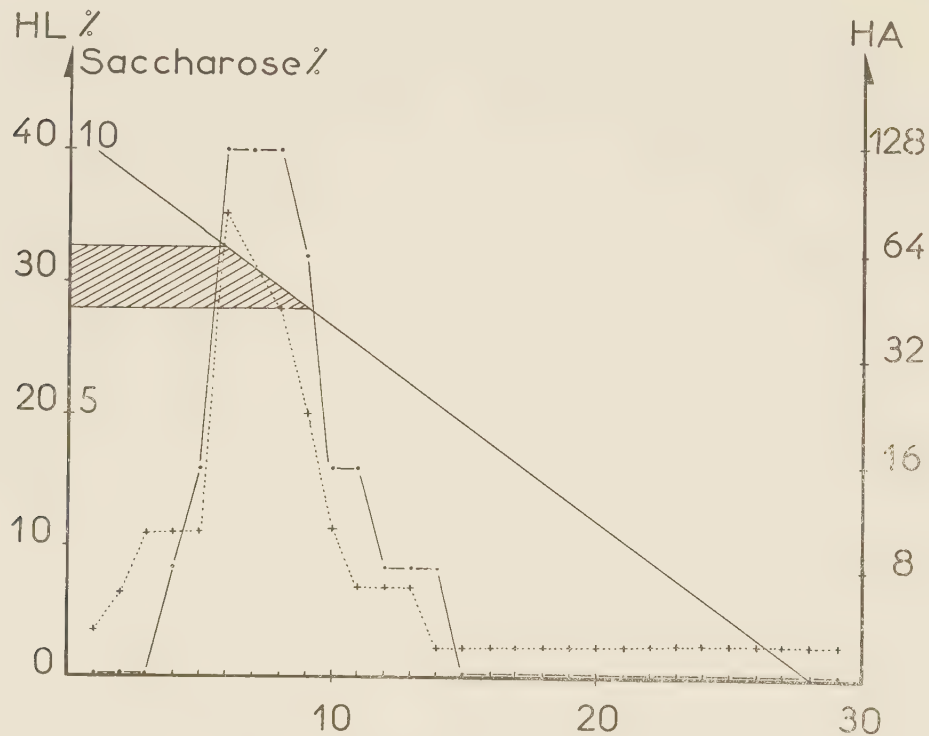


FIG. 71 - Répartition des activités hémagglutinante (x-----x) et hémolytique (.....) au cours d'une ultracentrifugation pendant 14 heures de Myxovirus parainfluenzae I préalablement soumis à une série de congélations - décongélations, en gradient de densité de saccharose 1-10 p.100 ; la zone hachurée correspond à la zone d'équilibre de ces particules.

D - CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DE PARTICULES VIRALES
CULTIVEES SUR CELLULES KB.

Les particules virales recueillies à partir d'une culture sur cellules KB sont concentrées par centrifugation pour élever le titre hémagglutinant qui est habituellement très faible. La figure 72 montre la répartition de l'activité hémagglutinante pour deux préparations successives non hémolytiques, titrant chacune au départ 256 unités Hirst (courbes A et B). On ne remarque pas cette fois l'apparition de deux pics éloignés caractéristiques, mais en revanche, on observe une zone centrale de sédimentation assez large.

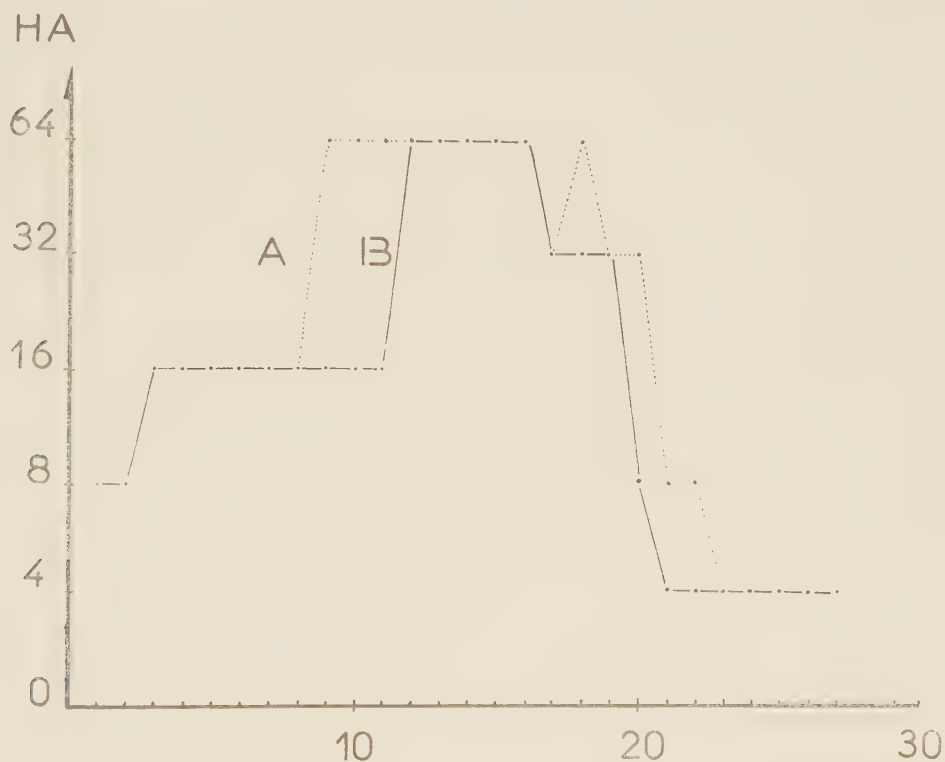


FIG. 72 - Répartition de l'activité hémagglutinante
au cours d'une ultracentrifugation de particules virales culti-
vées sur cellules KB, en gradient linéaire de saccharose 5-20 p.
100; A, premier lot de virus
B, second lot de virus.

La radioactivité est localisée dans les cinq fractions terminales, la quantité d'uracile marqué étant d'autant plus forte que la concentration en saccharose est plus faible (fig. 73).



FIG. 73 - Répartition de la radioactivité mesurée dans les fractions aliquotes recueillies au cours d'une ultracentrifugation en gradient de densité, de particules virales cultivées sur cellules KB préalablement marquées à l'uracile ($2\text{-I}^4\text{C}$); en ordonnées, nombre de coups par minute (bruit de fond soustrait).

E - CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DES MEMBRANES CHORIO-ALLANTOIQUES TRAITÉES PAR LE DESOXYCHOLATE DE SOUDE.

Dans les conditions où nous nous sommes placés, c'est-à-dire pour une concentration bien déterminée de desoxycholate de soude qui ne provoque pas d'hémolyse propre, mais dissocie la particule virale en détruisant son activité hémolytique tout en conservant son caractère hémagglutinant, la recherche de sous-unités hémolytiques en gradient de densité est négative, avec les membranes chorio-allantoïques infectées ou non, à 0° C ou à + 37°C.

F - RECHERCHE DU TITRE INFECTIEUX DES FRACTIONS I ET II (voir figure 70) RECUEILLIES APRES CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE DE PARTICULES BROYEES.

Dans cette expérience, le gradient de densité est effectué stérilement, de même que la récolte des fractions aliquotes. La recherche du pourcentage d'hémolyse met en évidence deux pics, le premier situé dans la zone des densités élevées, le second constitué par le surnageant de centrifugation à 28 000 tours/minute pendant trois heures.

La DI_{50} /ml calculée suivant la méthode indiquée dans notre chapitre I, et appliquée aux fractions I et II correspondant à ces deux pics, a donné respectivement $10^{-2,5}$ et $10^{-3,11}$.

III - DISCUSSION

L'ultracentrifugation en gradient de densité de saccharose 5 - 20 p.100, de Myxovirus parainfluenzae I cultivé sur oeufs embryonnés, met en évidence l'existence de deux catégories prédominantes de particules, la première sédimentant au fond du tube après trois heures à 28 000 tours/minute, la seconde restant en surface malgré des accélérations élevées. On

peut cependant déplacer cette deuxième catégorie de particules vers une zone intermédiaire, en changeant les caractéristiques d'ultracentrifugation en gradient de densité, notamment en utilisant un gradient linéaire de saccharose 1-10 p.100 et en centrifugeant pendant quatorze heures. Dans tous les cas, les activités hémagglutinante et hémolytique n'ont pu être séparées.

L'examen des préparations virales au microscope électronique n'a pas permis d'expliquer cette distribution car le polymorphisme des virions s'étend dans les deux cas, de manière identique entre 500 Å et 6000 Å.

On pouvait alors se demander si les particules qui ne sédimentaient pas, ne proviendraient pas plutôt de fragments viraux possédant encore les activités hémagglutinante et hémolytique. Cette hypothèse semble plausible car le broyage, contrôlé au microscope électronique, libère un grand nombre de sous-unités hémolytiques qui se trouvent exclusivement dans le surnageant. Cette constatation est encore renforcée par le fait que la radioactivité due à l'uracile marqué des ribonucléoprotéines (antigène soluble ou Ag S) libérées de la capside de Myxovirus parainfluenzae I cultivé sur cellule KB, n'est présente que dans les dernières fractions du gradient.

Il semble donc que l'activité hémolytique soit supportée, dans le cas où le virus est cultivé sur oeufs embryonnés, par une substance dont l'activité n'est pas liée à l'intégrité de la particule, mais qui peut au contraire se manifester à partir de fragments de capside libérés par microbroyage ou par une série de congélations suivies de décongélations, de la même manière que la propriété hémagglutinante.

La présence, dans le surnageant de centrifugation, d'un reliquat de très petites particules complètes, comme le montre la positivité du titre infectieux, complique encore la tentative de séparation de ces sous-unités.

Pour certains auteurs, l'hémolysine représenterait une substance supportée en commun par la particule virale et par les cellules de la membrane chorioallantoïque, mais devant l'échec des tentatives faites sur des membranes simplement broyées pour prouver cette hypothèse, Neurath (32I) utilise le désoxycholate de soude comme moyen de rupture de la cellule. Dans ce cas seulement et dans des conditions particulières d'hémolyse telle qu'une incubation à la température de + 37°C pendant 48 heures, avec une suspension d'hématies à 10 p. 100, il obtient des fractions hémolytiques à partir des membranes normales.

Nous verrons, au cours de notre étude sur l'action du désoxycholate de soude (chapitre IV) que celui-ci hémolyse à partir d'une certaine concentration et qu'une dose trop faible ne produit aucune désintégration virale. En utilisant des membranes chorioallantoïques traitées par une solution de desoxycholate de soude, dont la concentration correspond à celle où la particule virale est rompue, mais pour laquelle l'hémolyse ne se produit pas spontanément, nous n'avons pu mettre en évidence une activité hémolytique de type habituel après centrifugation en gradient de saccharose.

Il semble donc que l'activité hémolytique soit un phénomène accompagnant exclusivement la particule virale cultivée sur embryon de poulet, supportée par un principe qui se constitue au moment de la synthèse virale, mais qui ne provient pas de la simple juxtaposition d'une substance virale et d'une entité cellulaire préexistante.

CHAPITRE TROISIEME

RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE LES PROPRIETES HEMOLYTIQUE ET NEURAMINIDASIQUE DE *M. PARAINFLUENZAE I* PAR L'ETUDE DE L'ACTION DE LA TRYPSINE

On sait, depuis les travaux de Stone (322) en 1949, que la trypsine est capable de détruire à la fois la propriété hémagglutinante et le pouvoir infectieux de Myxovirus influenzae B. Hoyle et Davies (323), puis Cleeland et Sugg (324, 325), ont étendu cette observation à Myxovirus influenzae A, mais Merrill (326) a montré que certaines souches, telle que celle de la grippe du porc, pouvaient résister à l'action de la trypsine.

Gresser et Enders (327), en étudiant l'ensemble du groupe des Myxovirus ont mis en évidence la sensibilité particulière du virus Sendai à l'enzyme protéolytique. Ils ont proposé, de même que Sugg et Cleeland (328) d'utiliser les différences de résistance observées entre les souches comme un élément supplémentaire de classification des Myxovirus.

Enfin, récemment, Eremeyev et Zinchenko (329), puis Neurath (330) parallèlement à nos travaux sur cette action de la trypsine (Fontanges, Garrigue et Colobert (331) ,ont montré que la propriété hémolytique du virus Sendai est la plus fragile.

Les propriétés hémolytique et hémagglutinante de Myxovirus parainfluenzae I n'ayant pu être séparées au cours de notre étude précédente par la centrifugation en gradient de densité, mais l'activité enzymatique ne pouvant être titrée en présence de saccharose, nous avons, dans ce chapitre, comparé les cinétiques d'inactivation par la trypsine des activités

hémolytique et neuraminidasique pour tenter de dissocier leurs supports.

I - MATERIEL ET METHODES

A. - TRYPSINE. - On emploie la trypsine purifiée, fabriquée par l'Institut Pasteur de Paris, en solution saline à pH 7,2.

B. - INHIBITEUR DE LA TRYPSINE. - Le diisopropylfluorophosphate (DFP) * est conservé à la température de + 4°C, en solution 10^{-2} M dans l'alcool isopropylique anhydre, les dilutions convenables étant faites au moment de l'emploi.

C. - EFFET DE LA TRYPSINE. - On détermine tout d'abord l'effet de l'alcool isopropylique, puis du DFP sur les propriétés hémagglutinante, hémolytique et neuraminidasique du virus, en fonction du temps et à diverses concentrations.

Pour cela, un volume de liquide allantoïque infecté est mis en contact, suivant les cas, avec un volume égal d'une dilution dans la solution tampon de Cox (92), d'alcool isopropylique ou de la solution mère de D.F.P. Après des durées variables, on prélève 0,1 ml en vue de l'épreuve d'hémagglutination (HA), 0,25 ml pour déterminer le pouvoir hémolytique (HL) et 0,5 ml pour mesurer l'activité neuraminidasique (N) sur l'acide 3'lactose-lactaminique.

Pour étudier l'effet de la trypsine, on ajoute celle-ci au liquide allantoïque infecté, de façon à obtenir des concentrations finales variant entre 1 mg par ml et 0,025 mg par ml. Dans chaque prélèvement, on bloque l'action enzymatique en ajoutant le volume minimum nécessaire de solution de DFP, déterminé par les expériences précédentes.

* D.F.P. " Calbiochem ", Lab. Eurobio, 20 Bd St-Germain, Paris V°.

Comparativement, on réalise un essai sans trypsine et sans DFP, mais contenant l'alcool isopropylique, solvant du DFP. On mesure l'activité hémolytique et l'activité neuraminidasique de chaque prélèvement.

Tous ces ~~essais~~ sont effectués successivement aux températures de + 4°C, et de + 37°C.

II. RESULTATS

A. - EFFET DE L'ALCOOL ISOPROPYLIQUE. - A la température de + 4°C, l'alcool isopropylique ne modifie en rien la propriété hémolytique ; en revanche à + 37°C (tableau XXXI) le pouvoir hémolytique disparaît progressivement, d'autant plus rapidement que la concentration en alcool est plus élevée, à la concentration de 1/400 (v/v), l'alcool isopropylique n'a plus d'effet décelable après une heure de contact.

Tout au contraire, les propriétés hémagglutinante et neuraminidasique ne sont nullement modifiées, quelles que soient la concentration et la durée des essais.

B. - ACTION DU D.F.P. EN SOLUTION DANS L'ALCOOL ISOPROPYLIQUE. - L'addition de DFP introduit en solution dans l'alcool isopropylique ne modifie en rien les résultats ; aux concentrations utilisées, le DFP n'a donc aucune action propre sur les particules virales.

C. - ACTION DE LA TRYPSINE. - Dans une expérience préliminaire, nous avons utilisé la trypsine à la concentration finale de 1 mg par ml. A chacun des prélèvements de 0,9 ml, on ajoute 0,1 ml d'une dilution au 1/50 ème dans le tampon de Cox, de la solution mère de DFP ; ainsi, la concentration finale d'alcool isopropylique est telle qu'elle ne peut modifier l'activité hémolytique. Dans ces conditions, à la température de + 37°C,

on observe une chute rapide de l'activité hémolytique suivant une courbe d'allure exponentielle (fig. 74).

Si on opère sans DFP, on observe une destruction plus faible, mais encore importante, du pouvoir hémolytique (comparer les courbes R 37 et T 37 de la figure 74), due au fait que l'action de la trypsine continue pendant la durée même du dosage.

A la température de + 4°C, la vitesse de destruction est très rapide, et la courbe peut être considérée comme linéaire.

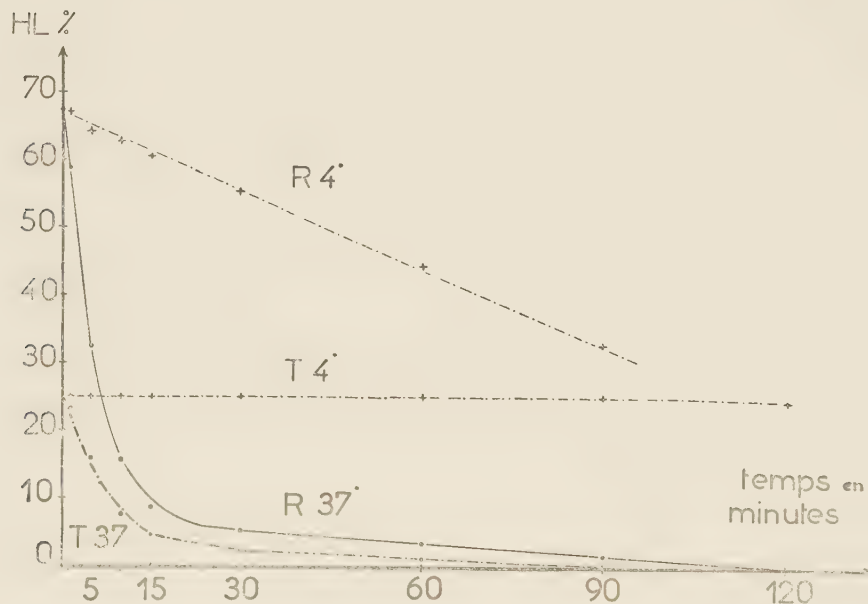


FIG. 74 - Influence de la trypsine aux températures de 37°C et 4°C sur le pouvoir hémolytique.

R = le DFP a été ajouté au moment du prélèvement ;

T = le DFP n'a pas été ajouté.

Comme le montre la fig. 75, à + 4°C, l'activité neuraminidasique ne subit aucune modification ; en revanche à + 37°C, sa diminution est très rapide, d'allure exponentielle et analogue à celle observée pour l'ac-

Concentration finale d'alcool isopropylique	Moment du prélèvement	I mn	5 mn	10 mn	15 mn	30 mn	60 mn	120 mn
I/50	HA	320	320	320	320	320	320	320
	HL	31	25	17	14	6	5	4
	N	0,0018			0,0018	0,0017		0,0018
I/100	HA	320	320	320	320	320	320	320
	HL	31	29	28	28	25	18	9
	N	0,0018			0,0017	0,0018		0,0018
I/200	HA	320	320	320	320	320	320	320
	HL	31	29	29	29	25	20	10
	N	0,0018			0,0019	0,0018		0,0018
I/400	HA	320	320	320	320	320	320	320
	HL	31	29	28	28	28	28	25
	N	0,0019			0,0018	0,0017		0,0017

Tableau XXXI - Effet de l'alcool isopropylique à + 37°C à des concentrations différentes, et en fonction du temps sur les propriétés hémagglutinante (HA) exprimées en unités Hirst, hémolytique (HL) exprimées en pourcentage d'hémolyse, et neuraminidase (N) exprimées en unités conventionnelles.

tivité hémolytique (fig. 74).

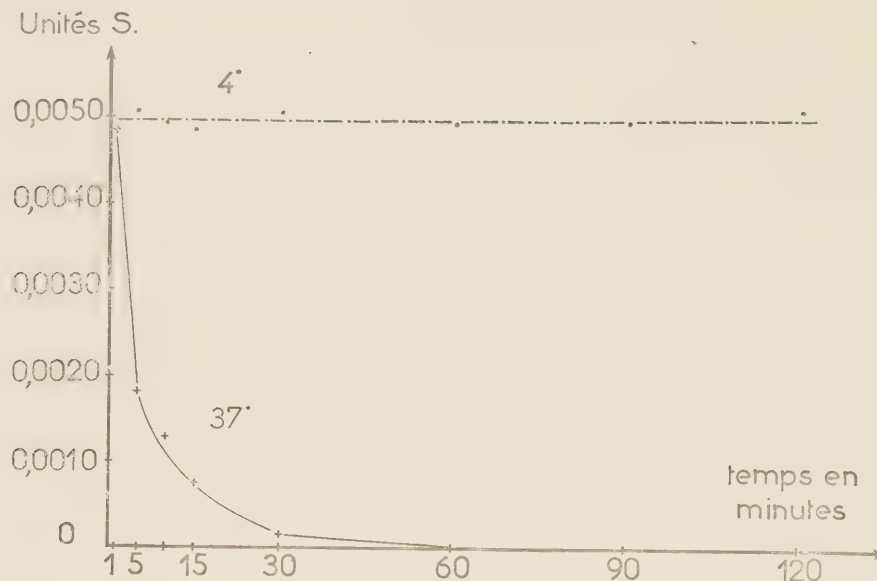


FIG. 75 - Influence de la trypsine sur l'activité neuraminidasique à la température de 37°C et à 4°C.

D. - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN TRYPSINE. - La figure 76 met en évidence l'effet de la concentration en trypsine, la température d'expérience étant de + 37°C. Une concentration de 0,025 mg par ml est insuffisante pour modifier les propriétés hémolytique et neuraminidasique du virus (tableau XXXII), mais cette modification est manifeste quoique faible, à la concentration de 0,05 mg/ml ; à la concentration de 1 mg/ml, la destruction devient très importante dans un temps très court.

III - DISCUSSION

Nos observations montrent que dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I ; la trypsine détruit à la fois, et dans des conditions analogues, la propriété hémolytique et le caractère neuraminidasique, ce qui empêche

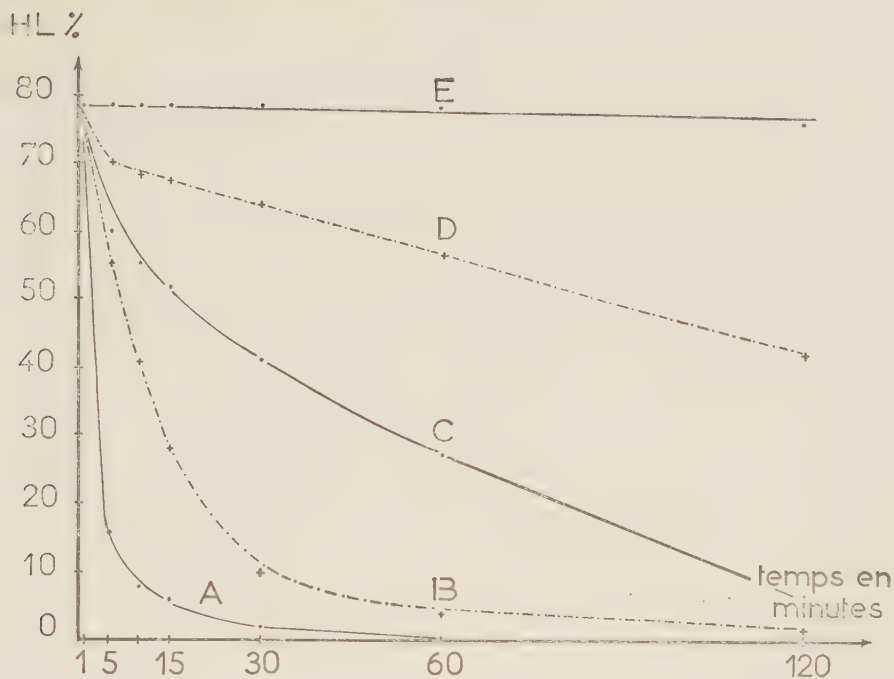


FIG. 76 - Variation de l'activité hémolytique en fonction du temps, pour des concentrations différentes de trypsine, à la température de 37°C.

- A = 1 mg/ml
- B = 0,20 mg/ml ;
- C = 0,10 mg/ml ;
- D = 0,05 mg/ml ;
- E = 0,025 mg/ml.

l'utilisation de cette méthode comme moyen de séparation et, par conséquent d'isolement.

On ne peut cependant en conclure que le support de ces deux propriétés est identique puisque l'alcool isopropylique, de même que le méthanol, détruit l'activité hémolytique tout en respectant la propriété neuraminidasique.

En revanche, le pouvoir hémagglutinant est conservé, pendant les cent-vingt minutes d'expérience.

On sait que par précipitation méthanolique, récolte du culot par ultracentrifugation, puis désorganisation par l'éther des particules virales complètes, contenues dans le culot, on obtient des éléments de diamètre voisin de 30 m μ et qui possèdent à la fois les propriétés hémagglutinante et neuraminidasique. Dans le cas des souches très résistantes à l'action de la trypsine (Asia, PR₈), Mayron, Robert, Winzler et Rafelson (219) ont pu réaliser la dissociation de ces activités grâce à une digestion par la trypsine, prolongée pendant seize heures.

Les résultats que nous avons présentés dans le tableau XXXI définissent les conditions de concentrations en trypsine et de durée d'incubation où il faudrait se placer dans le cas du virus Sendaï, pour espérer dissocier l'une de l'autre, la propriété hémagglutinante et la propriété neuraminidasique.

Si la neuraminidase doit nécessairement présenter, comme tous les enzymes, un copule protéinique, sa destruction par une protéinase ne pose pas de problème particulier. En revanche, nous avons démontré, au cours du chapitre VII, que les cinétiques d'hémolyse ne sont pas de type enzymatique.

On pouvait penser que la désorganisation de la particule virale complète et la dissociation de ses éléments structuraux sous l'influence de la trypsine, comme l'ont démontré Valentine et Issacs (332, 333) par une étude au microscope électronique, aboutissaient à la libération d'éléments qui, en s'organisant en micelles autour de phospholipides hémolytiques, inhiberaient cette activité. En réalité, puisque l'hypothèse de la nature lysophosphatidique ne peut être retenue, comme nous l'avons indiqué dans notre chapitre I deuxième partie, nous pouvons admettre que le principe responsable de l'activité hémolytique possède également un copule protéinique détruit par l'action de l'enzyme protéolytique.

Concentration de trypsine	Moment du prélèvement	I mn	5 mn	10 mn	15 mn	30 mn	60 mn	120 mn
A 1 mg/ml	HL	36	15	8	5	2	0	0
	N	0,0015	0,0003	0,0003	0	0	0	0
B 0,20 mg/ml	HL	70	55	41	28	10	4	2
	N	0,0020	0,0020	0,0017	0,0013	0,0002	0	0
C 0,10 mg/ml	HL	75	60	55	52	42	27	8
	N	0,0020	0,0020	0,0018	0,0015	0,0008	0,0003	0,0002
D 0,05 mg/ml	HL	77	70	68	67	65	58	44
	N	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020	0,0015	0,0006
E 0,025 mg/ml	HL	79	79	79	79	79	79	77
	N	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020	0,0020

Tableau XXXII - Effet de la trypsine à des concentrations variables et en fonction du temps sur les propriétés hémolytique (HL) et neuraminidase (N) à la température de + 37°C.

CHAPITRE QUATRIEME

RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE LES SUPPORTS DES ACTIVITES HEMAGGLUTINANTE NEURAMINIDASIQUE, HEMOLYTIQUE ET INFECTIEUSE PAR L'ETUDE DE L'ACTION DE DIFFERENTS TRAITEMENTS PHYSIQUES OU CHIMIQUES

La centrifugation en gradient de densité ne permettant pas la séparation entre elles des molécules supports des activités hémagglutinante et hémolytique, et la trypsine provoquant l'inactivation rapide des caractères neuraminidasique et hémolytique, nous avons dû choisir d'autres agents physiques et chimiques pour tenter d'isoler ces propriétés.

L'action de la température a été utilisée pour la première fois en 1948 par Morgan, Enders et Wagley (233) sur le virus ourlien, pour séparer les activités hémagglutinante et hémolytique. Pour Chu et Morgan (334), la perte de cette dernière propriété peut être considérée comme la première étape dans la dégradation d'un virus hémolytique, puisque l'activité hémagglutinante est conservée après un traitement par le formol, une incubation de 45 minutes à la température de + 50°C ou une irradiation au rayonnement ultraviolet, tandis que la propriété hémolytique disparaît rapidement.

Parallèlement à ces résultats obtenus avec le virus ourlien, Kilham (234), Granoff et Henlé (247), Mac Collum et Brandly (244), Sagik et Levine (249) mirent en évidence l'augmentation du titre hémolytique de plusieurs souches de virus de la maladie de Newcastle lorsqu'elles étaient soumises à une série de congélations suivies de décongélations. En revanche un bombardement électronique de forte énergie montrait la disparition du

caractère hémolytique (Wilson (335)).

L'action de l'éther fut mise en évidence chez Myxovirus parainfluenzae I par Hosaka (252), Sokol, Blaskovic et Rosenberg (336), Sokol, Blaskovic et Krizanova (337), Sokol, Blaskovic et Krizanova - Laucikova (338), Sokol et Neurath (339) qui montrèrent la disparition de l'activité hémolytique lors des préparations des sous-unités virales.

Une étude plus générale fut entreprise par Neurath (340) à l'aide de certains réactifs chimiques comme l'acide nitreux, le sulfure de carbone, le formol, le phénylisothiocyanate, le 2 - 4 dinitrofluorobenzène, l'urée à la concentration 8 M qui détruisaient électivement les groupements - NH₂.

Les ultra-sons ont également été employés, permettant à Hermodsson (341) d'observer une augmentation caractéristique de l'activité hémagglutinante des Myxovirus du groupe parainfluenzae, augmentation retrouvée par Hannoun, Prudhomme et Giuntini (342) lorsque l'expérience était effectuée à l'air libre. Cette activité disparaissait, en revanche, si l'atmosphère était constituée exclusivement par de l'hydrogène.

Enfin, Buckland et Tyrrel (343) utilisant l'action de différents agents physiques et chimiques, tels que la chaleur, l'éther, le formol, le périodate, la papaïne, l'urée et le desoxycholate de soude classèrent 22 souches virales d'après le degré de sensibilité de leur propriété hémagglutinante vis-à-vis de ces différents agents.

Dans ce chapitre, nous avons repris l'étude de l'action des agents physiques et chimiques, mais sur les trois propriétés caractéristiques de Myxovirus parainfluenzae I, en insistant sur leur cinétique d'inactivation pour tenter de les séparer.

I. - EFFET DE LA CONGELATION

A. - ETUDE DES PROPRIETES HEMAGGLUTINANTE ET HEMOLYTIQUE APRES UN SEJOUR DE 18 HEURES A DIFFERENTES TEMPERATURES. -

On utilise un liquide allantoïque qui titre 320 unités hémagglutinantes Hirst et qui présente un degré d'hémolyse de 94 %. On le partage en cinq lots qui sont déposés respectivement aux températures de +20°C, +4°C, -10°C, -30°C, et -70°C (fig. 77.A). Après dix-huit heures, on recherche les titres hémagglutinant et hémolytique par les techniques déjà décrites. Le lot III, qui est resté à la température de -10°C montre une chute importante du titre hémolytique tandis que sa propriété hémagglutinante est conservée (fig. 77.B).

Si les lots I, II, IV et V sont ensuite placés à la température de -10°C pendant 18 heures, on remarque, sur l'ensemble des lots, une chute importante du pouvoir hémolytique sans modification de l'activité hémagglutinante.

Le lot III, congelé à la température de -30°C ne retrouve pas son caractère hémolytique (fig. 77.C).

Une autre série d'expériences, effectuée avec du liquide allantoïque moins hémolytique (HL = 29 %, HA = 160 U. Hirst) permet d'obtenir une suspension virale dépourvue de cette propriété hémolytique, après un séjour de 18 h à la température de -10°C (tableau XXXIII).

Si les lots A, B, D, E, sont ensuite placés (après décongélation des lots D et E) à la température de -10°C pendant vingt heures, leur activité hémolytique disparaît totalement.

Lot	A	B	C	D	E
température de stockage	+ 20°C	+ 4°C	- 10°C	- 30°C	- 70°C
HL %	29	29	0	28	29
HA (U. Hirst)	160	160	160	160	160

Tableau XXXIII - Etude des propriétés hémolytique et hémagglutinante de M. parainfluenzae I après un séjour de 18 heures à différentes températures.

B. - CINETIQUE DE L'HEMOLYSE A LA TEMPERATURE DE - 10°C.

On prend vingt tubes à essais, contenant chacun 0,25 ml de liquide allantoïque infecté provenant d'un lot dont les titres hémagglutinant et hémolytique sont respectivement de 640 Unités Hirst et de 82 %. On suit la cinétique d'inactivation à la température de - 10°C de la propriété hémolytique, en recherchant celle-ci toutes les heures pendant vingt-quatre heures. La figure 78.B montre une courbe de type exponentiel négatif. Une expérience parallèle, effectuée à la température de - 8°C, produit une courbe d'allure voisine, mais de pente à l'origine plus faible (fig. 78.A).

C. - RECHERCHE DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE APRES INOCULATION A DES OEUFs EMBRYONNES DE 9 JOURS, D'UN LIQUIDE ALLANTOIQUE INACTIVE PARTIELLEMENT OU TOTALEMENT A LA TEMPERATURE DE - 10°C.

On part d'un liquide allantoïque qui titre 640 U. hémagglutinantes Hirst et qui présente une hémolyse de 77 %. Cette suspension virale est répartie en quatre lots dont trois sont placés à la température de

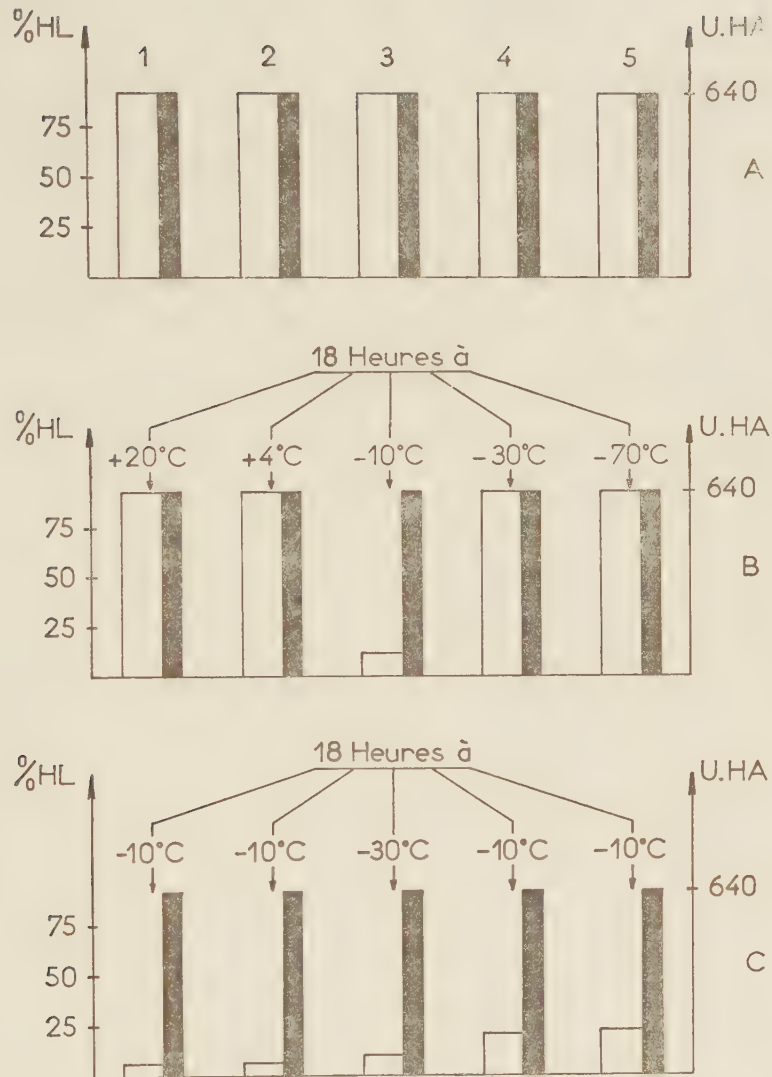


FIG. 77 - Etude des propriétés hémagglutinante et hémolytique de *Myxovirus parainfluenzae* I après conservation à des températures différentes.

□ HL

■ HA

- 10°C, respectivement pendant cinq heures (lot II), 16 heures (lot III) et 48 heures (lot IV). Les titres hémagglutinants sont conservés, mais les pourcentages d'hémolyse s'abaissent respectivement à 20 %, 8 %, et 6 %, (fig. 79).

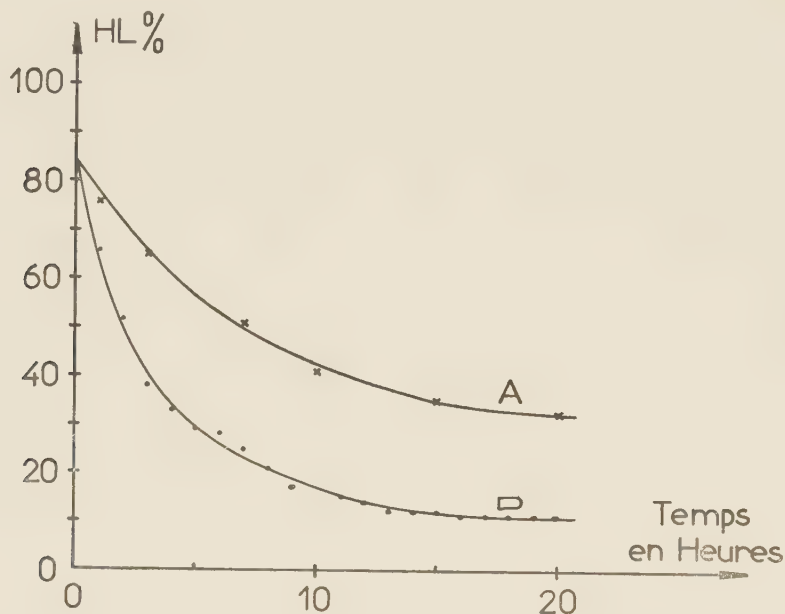


FIG. 78 - Cinétique d'inactivation de la propriété hémolytique pour des suspensions de Myxovirus parainfluenzae I conservées à l'état de surfusion à la température de - 8°C (courbe A) et de - 10°C (courbe B).

Chaque lot est alors inoculé à 15 oeufs embryonnés au 9ème jour. Après un temps d'incubation de 48 h, aux conditions optimales de température et de degré hygrométrique que nous avons définies précédemment, chaque liquide allantoïque est récolté après passage préalable des oeufs à + 4°C pendant 12 heures. La valeur moyenne des titres hémagglutinant et hémolytique est alors calculée pour chaque lot. On remarque sur la figure 79 que le lot récolté est d'autant moins hémolytique qu'il provient d'un inoculum ayant séjourné plus longtemps à la température de - 10°C alors

que le titrage hémagglutinant donne des résultats superposables, compte tenu de la précision relative de cette méthode.

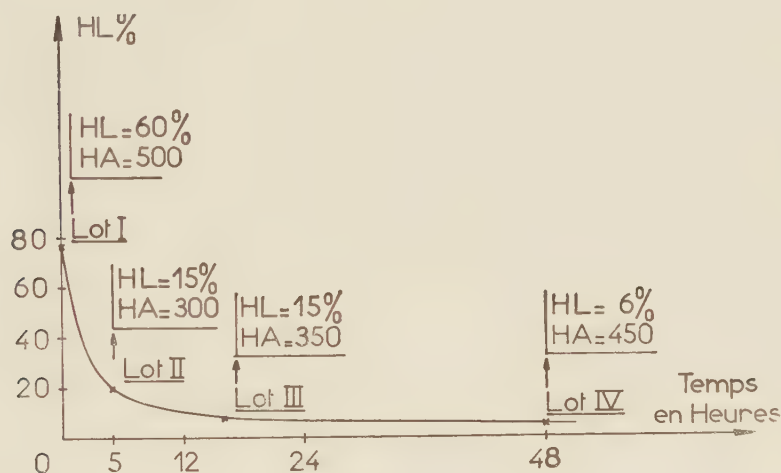


FIG. 79 - Cinétique d'inactivation de la propriété hémolytique pour un liquide allantoïque infecté à l'aide de M.parainfluenzae I conservé à l'état de surfusion à la température de -10°C . En médaillon, titres hémagglutinant et hémolytique moyens, obtenus après inoculation des différents lots de virus plus ou moins inactivés, à des oeufs embryonnés de 9 jours, inoculation suivie d'une incubation de 48 h à 35°C .

D. - RECHERCHE DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE APRES STOCKAGE DU LIQUIDE ALLANTOIQUE INFECTE A LA TEMPERATURE DE -10°C .

On utilise trois lots de liquides allantoïques provenant respectivement des lots I, II, et IV de l'expérience précédente. Après un séjour de 24 h à -10°C , le pouvoir hémolytique disparaît mais les pouvoirs hémagglutinant et neuraminidasique (tableau XXXIV) sont conservés

		Temps 0	Après 24 h à - 10°C	Après 48 h à - 10°C
IV	HA	160	80	80
	HL	10	0	0
	N	0,007	0,006	0,007
II	HA	160	160	80
	HL	20	0	0
	N	0,027	0,023	0,021
I	HA	160	320	320
	HL	49	0	0
	N	0,037	0,034	0,031

Tableau XXXIV - Etude de la variation des titres hémagglutinant (HA, en Unités Hirst), hémolytique (HL, en pourcentage d'hémolyse) et neuraminidase (N, en unités conventionnelles) en fonction de la durée du stockage à - 10°C, pour trois lots d'origine différentes (I, II, IV, voir fig. 79).

pendant les quarante-huit heures d'observation.

E. - EFFET DE LA CONGELATION A LA TEMPERATURE DE - 10°C.

Au cours de nos expériences, certains liquides allantoïques infectés, conservés à la température de - 10°C, ne perdaient pas leur propriété hémolytique. Or, chaque fois que se produisait ce phénomène, on remarquait que le liquide allantoïque était à l'état congelé. Pour tenter de l'expliquer, on prend un liquide allantoïque qui titre 40 Unités hémagglutinantes et qui présente une hémolyse de 10%, et on le répartit en deux tubes placés à la température de - 10°C. Dès que celle-ci est atteinte par programmation dans le tube II, on introduit avec une pince fine, une fraction de liquide allantoïque à l'état solide, obtenu par congélation à la température de - 30°C. Au moment où le cristal entre en contact avec la suspension virale liquide, la congélation totale se produit ce qui s'explique par un état antérieur de surfusion. On effectue ensuite une série de congélations à - 10°C suivie de décongélations à + 37°C. La recherche de l'activité hémolytique du lot I, qui est resté 24 h à l'état liquide à la température de - 10°C, comparativement à celle du lot II, conservé congelé à cette même température, montre une inactivation totale de cette propriété (tableau XXXV).

	Lot initial	Lot I, conservé à l'état liquide à - 10°C, pendant 24 h.	Lot II, congelé à - 10°C				
			I ère décongélation	2ème	3ème	4ème	5ème
HL %	10	0	10	12	12	11	11

Tableau XXXV - Etude comparative de l'activité hémolytique de M. parainfluenzae I entre un lot (I) conservé à l'état de surfusion et un lot (II) conservé congelé.

F - TITRES INFECTIEUX DES LIQUIDES ALLANTOIQUES CONSERVES AUX TEMPERATURES DE + 4°C, -10°C, et -30°C.

Une suspension virale titrant 320 unités Hirst, 77 % d'hémolyse et $10^{-10,2}$ du point de vue infectieux (DI_{50}), est divisée en trois lots que l'on place pendant 48 heures, aux températures respectives de + 4°C (lot I), de -10°C (lot II) et de -30°C (lot III).

Après décongélation du lot III et recherche des propriétés hémagglutinante, hémolytique et infectieuse, on observe une chute de ces deux derniers dans le lot II (tableau XXXVI).

	Lot I (+ 4°C)	Lot II (-10°C)	Lot III (-30° + 37°) ⁴
HA unités Hirst	320	160	320
HL %	14	0	61
DI_{50}	$10^{-10,53}$	$10^{-6,4}$	$10^{-10,40}$

Tableau XXXVI - Etude des titres hémagglutinant, hémolytique et infectieux de Myxovirus parainfluenzae I, en fonction de la température de conservation (le lot II est conservé à l'état de surfusion).

G - EFFET DE LA CONGELATION A LA TEMPERATURE DE -70°C SUR UN LOT DE VIRUS SENDAI CONSERVE A -10°C.

Un lot de liquide allantoïque, qui a perdu son pouvoir hémoly-

tique après 48 heures à la température de -10°C , mais qui a conservé ses titres hémagglutinant et neuraminidasique est soumis à une série de cinq congélations à -70°C suivies de décongélations à $+37^{\circ}\text{C}$. Le pouvoir hémolytique reste nul (tableau XXXVII).

	Virus départ	48 h à -10°C	Après cinq congélations à -70°
HA	160	80	80
N	0,027	0,025	0,027
HL	20	0	0

Tableau XXXVII - Etude des propriétés hémagglutinante (HA en unités Hirst), neuraminidasique (N en unités conventionnelles) et hémolytique (HL en pourcentage d'hémolyse) d'une suspension de Myxovirus parainfluenzae I après un séjour de 48 heures à la température de -10°C à l'état de surfusion, séjour suivi d'une série de congélations- décongélations.

H - EFFET DES CONGELATIONS - DECONGELATIONS SUR DIFFERENTS LOTS RECOLTES APRES INOCULATION DE LIQUIDES ALLANTOIQUES INFECTES, MAIS PLUS OU MOINS INACTIVES PAR CONSERVATION A LA TEMPERATURE DE -10°C .

Après avoir séparé préalablement les lots I' et III' de la figure 79 (liquides allantoïques récoltés respectivement à partir des lots I et III qui ont servi à l'inoculation), en deux fractions constituées d'une part, par des liquides allantoïques très faiblement hémolytiques (I'_I et III'_I) et d'autre part, par les liquides allantoïques restants (I'₂ et

Congélation décongélation		0	I	2	3	4	5
lot I' _I	HA	160	160	160	160	160	160
	HL	13	10	24	36	45	57
lot I' ₂	HA	320	320	320	320	320	320
	HL	28	29	50	61	65	78
lot II'	HA	320	320	320	320	320	320
	HL	22	41	68	81	86	93
lot III' _I	HA	160	160	160	160	160	160
	HL	10	9	33	45	53	66
lot III' ₂	HA	320	320	320	320	320	320
	HL	37	41	64	75	81	87
lot IV'	HA	160	320	320	320	320	320
	HL	80	78	84	90	93	96

Tableau XXXVIII - Effet du nombre de congélations à - 70°C sur les activités hémagglutinante (HA, en unités Hirst) et hémolytique (HL, en pourcentage d'hémolyse) de différents lots de virus Sendai.

III'₂), on congèle les six nouveaux lots obtenus à la température de -70° C. Au fur et à mesure que le nombre de congélations augmente, le pouvoir hémolytique s'élève, alors que le pouvoir hémagglutinant reste constant (tableau XXXVIII).

I - EFFET DE LA CONGELATION A LA TEMPERATURE DE -196°C .

L'appareillage comprend un récipient calorifugé type INR 35/9 * muni de six canisters et contenant 33,5 litres d'azote liquide. On utilise un lot de liquide allantoïque infecté, centrifugé à 5000g pendant dix minutes et titrant 32 unités hémagglutinantes Hirst, 0,0110 unité neuraminidase conventionnelle, 24 % d'hémolyse. On le répartit en quatre fractions d'égal volume qui sont soumises à une série de cinq congélations à la température de -196°C pendant des temps de cinq minutes (fraction A), dix minutes (fraction B), quinze minutes (fraction C) et six heures (fraction D), suivie chaque fois d'une décongélation à +37°C.

Après chaque décongélation, on effectue les trois titrages habituels.

Le tableau IXL nous montre que les titres hémagglutinant et hémolytique sont modifiés dès la première congélation, quel que soit le temps de contact à la température de -196°C, mais qu'ils restent stables au cours du cycle d'expériences. En revanche, le pouvoir neuraminidase reste constant pendant toute l'opération.

L'addition d'une solution de saccharose 0,3 M à concentration croissante, pour essayer de diminuer l'action brutale de la congélation à -196° C sur la structure virale ne modifie pas le degré d'hémolys comme l'indique le tableau XL.

J - ETUDE DE LA RESISTIVITE AU COURS DES CONGELATIONS.

La résistivité des solutions liquides est fonction de la structure

* "L'Air Liquide", 65 rue Paul Cazeneuve , LYON 8ème.

température	temps de congélat.		U. HA	% HL	unités Neuraminidasiques
+ 4°C (lot témoin)	0		32	24	0,0110
- 196°C (lot A)	5 mn	A 1	128	41	0,0110
		A 2	128	41	
		A 3	128	55	
		A 4	128	55	
		A 5	128	55	0,0110
- 196 °C (lot B)	10 mn	B 1	128	52	0,0108
		B 2	64	55	
		B 3	128	53	
		B 4	128	55	
		B 5	128	55	0,0090
- 196°C (lot C)	15 mn	C 1	64	53	0,0086
		C 2	64	55	
		C 3	64	53	
		C 4	64	55	
		C 5	64	55	0,0090
- 196°C (lot D)	6 h	D 1	128	53	0,0090
		D 2	64	55	
		D 3	64	55	
		D 4	128	53	
		D 5	256	55	0,085

Tableau IXL - Effet de la congélation de Myxovirus parainfluenzae I à la température de - 196°C, en fonction du temps et du nombre de congélations, sur les activités hémagglutinante, hémolytique et neuraminidasique.

	Virus + sacch. 20 %	Virus congelé à - 196°C	Virus + 5 % sacch. - 196°C	Virus + 10% sacch. - 196°C	Virus + 20% sacch. - 196°C	Virus congelé à - 196°C puis addition de sac- ch. 20 %
HA	80	160	160	160	160	160
% HL	10	39	38	38	37	40

Tableau XL - Effet du saccharose sur les activités hémagglutinante (HA en unités Hirst) et hémolytique (HL en pourcentage d'hémolyse) du virus Sendai pendant la congélation à la température de -196°C.

d'une substance, c'est pourquoi divers facteurs physiques tels que la température, la pression mécanique, modifient sa valeur.

Puisque la congélation a pour effet de désorganiser la particule virale comme nous le montre l'examen au microscope électronique, on peut penser que cette modification de structure s'accompagne d'une variation de la résistivité en fonction du nombre de congélations. Après avoir remarqué qu'il existe une relation entre le temps de congélation d'un même liquide allantoïque infecté et la variation de la résistivité en fonction de l'élévation de la température de -80°C à 0°C, nous avons choisi le temps arbitraire de congélation de 2 h.30.

On remarque, sur la figure 80, que les variations de la résistivité sont peu caractéristiques, alors que la courbe d'hémolyse est de type exponentiel positif en fonction du nombre de congélations.

* La mesure de la résistivité a été effectuée à l'aide de l'appareil "Usifroid", Boulogne-Billancourt (Seine), 9, rue Moreau-Vauthier.

*

*

*

Si la congélation d'une suspension virale de Myxovirus parainfluenzae I n'a aucun effet sur l'activité neuraminidasique, en revanche elle élève de façon constante le titre hémolytique et quelquefois le titre hémagglutinant. Lorsqu'on utilise des températures très basses de congélation telles que -196°C en azote liquide, le temps et le nombre de congélations importe peu, contrairement à l'action des températures plus élevées de -70°C et de -30°C , ce qui peut s'expliquer par les résultats de l'étude de la résistivité de ces systèmes, résistivité qui traduit l'état d'organisation du solide et qui est d'autant plus élevée que la température est plus basse, c'est-à-dire que la modification structurale est plus importante.

Aux températures de -70°C et de -30°C , il est donc nécessaire de pratiquer plusieurs congélations successives, si les temps d'exposition sont relativement courts, pour obtenir un degré d'hémolyse maximal, puisque la désorganisation de la particule n'est pas totale.

Le stockage à la température de -10°C d'un liquide allantoïque infecté maintenu à l'état de surfusion par programmation, fait disparaître le pouvoir hémolytique tout en conservant les titres hémagglutinant et neuraminidasique de la suspension. Cette disparition s'accompagne d'une baisse importante du pouvoir infectieux et l'inoculation à des oeufs embryonnés de 9 jours se traduit après 48 heures d'incubation par la récolte d'un liquide allantoïque faiblement hémolytique alors que le titre hémagglutinant moyen est voisin de la normale.

Il semble donc exister une relation entre les activités hémolytique et infectieuse, plus fragiles que les autres propriétés biologiques virales, au cours de la transmission de l'infection.

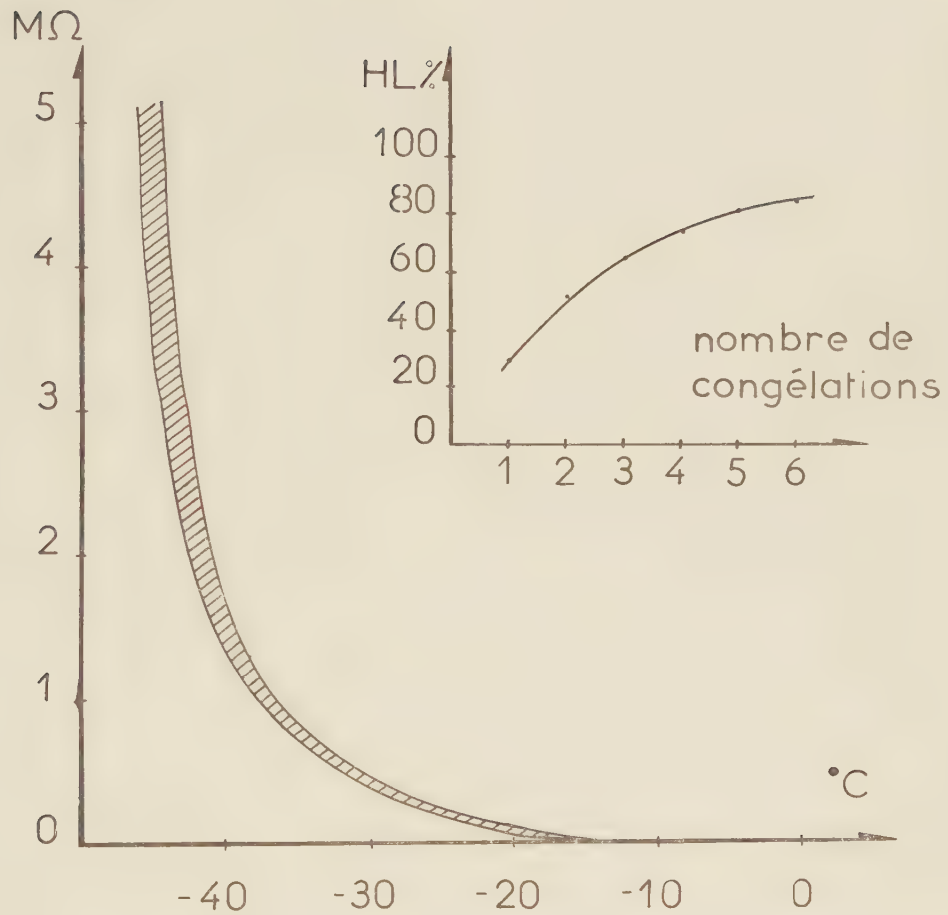


FIG. 80 - Variations de la résistivité en $M\Omega$ d'une suspension de Myxovirus parainfluenzae I en fonction de la température. La courbe obtenue est l'enveloppe des points correspondants à 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 décongelations, en médaillon, pourcentage d'hémolyse en fonction du nombre de congélations pour le même liquide allantoïque infecté.

II - ACTION DU BROYAGE SUR LES PARTICULES VIRALES

On utilise un broyeur à billes de verre de diamètre 0,11 - 0,12mm à la vitesse I, refroidi sous détente de gaz carbonique et un lot de virus Sendai qui titre 40 unités hémagglutinantes Hirst et 38 % d'hémolyse. On répartit ce lot en plusieurs fractions qui sont broyées pendant des durées de 1 à 5 minutes, puis on centrifuge à 5000 g pendant 15 minutes pour éliminer les billes de verre.

Le tableau XLI montre l'accroissement des titres hémagglutinant et hémolytique en fonction du temps de broyage.

Temps en minutes	0	1	2	3	4	5
HL	38	62	72	72	84	87
HA	40	640	320	640	1280	1280
Températures après broyage	2°C	1°C	1°C	1,5°C	2°C	4°C

Tableau XLI - Etude des activités hémolytique (HL en pourcentage d'hémolyse) et hémagglutinante (HA en unités Hirst) de Myxovirus parainfluenzae I en fonction de la durée du broyage.

Il suffit d'ailleurs de quelques secondes de broyage, comme l'indique le tableau XLII pour observer une augmentation des titres hémagglutinant et hémolytique. Dans tous les cas, l'activité neuraminidasique reste la même.

Si on compare l'effet de la congélation à celui produit par le bro-

yage, on remarque, dans ce dernier cas seulement, une augmentation du titre hémagglutinant (tableau XLIII) tandis que les titres infectieux restent très voisins (tableau XLIII).

	Temps de contact en secondes	HA	% HL	Unités Neuraminidasiques
I (+ 4°C)	0	512	30	0,0220
	15	2048	35	0,0240
	30	1024	39	0,0260
	45	1024	42	0,0260
	60	512	48	0,0268
II (- 70° + 37°C)	0	512	38	0,0160
	15	1024	47	0,0136
	30	1024	50	0,0144
	45	1024	53	0,0158
	60	1024	56	0,0132

Tableau XLII - Mesure des activités hémolytique, hémagglutinante et neuraminidasique du virus Sendai, en fonction de la durée du broyage pour deux lots de virus, le premier conservé à la température de + 4°C, le second conservé congelé à - 70°C.

*

* *

L'effet du broyage sur l'activité hémagglutinante n'est donc pas superposable à celui que l'on peut observer après une série de congélations - décongélations. On peut penser que la désorganisation est plus complète, créant ainsi de nombreuses sous-unités hémagglutinantes.

		HA	HL	N	DI ₅₀
A	+ 4°C	32	36	0,095	10 ^{-9,6}
B	(-70° +37°)	32	91	0,0100	10 ^{-9,33}
C	broyage : 1 mn	512	83	0,0091	10 ^{-9,33}

Tableau XLIII - Etude comparative des activités hémagglutinante (Ha en unités Hirst), hémolytique (HL en pourcentage d'hémolyse), neuraminidasique (N en unités conventionnelles) et infectieuse (DI₅₀) entre trois lots d'une suspension de virus Sendai ayant subi des traitements différents.

La conservation du titre infectieux pourrait signifier que seul l'équipement nucléoprotéinique interne, libéré au cours du broyage est nécessaire pour la transmission de l'infection, mais on n'est jamais certain, malgré un contrôle au microscope électronique que toutes les particules virales soient bien dissociées.

III - ACTION DE LA TEMPERATURE

Dans un premier temps, on détermine la température approximative de dénaturation des principes responsables de l'hémagglutination, de l'hémolyse et de l'activité enzymatique du virus grippal en pratiquant les réactions correspondantes après avoir soumis la suspension de Myxovirus parainfluenzae I à des températures croissantes de + 30°C à + 60°C pendant des temps de 30, 60 et 90 minutes, sous agitation.

A la température de + 50°C et après trente minutes de traitement, la particule virale perd ses propriétés hémagglutinante et neuraminidase, tandis que l'activité hémolytique est conservée (tableau XLIV), mais ce résultat peut être dû à la différence de sensibilité des méthodes de titrage.

Dans un second temps, on suit la cinétique de dénaturation de ces propriétés à la température de + 45°C, choisie d'après l'observation du tableau XLIV. Les fonctions représentatives de ce phénomène sont de type exponentiel négatif pour les principes hémagglutinant et hémolytique (fig. 8I) avec des pentes à l'origine différentes.

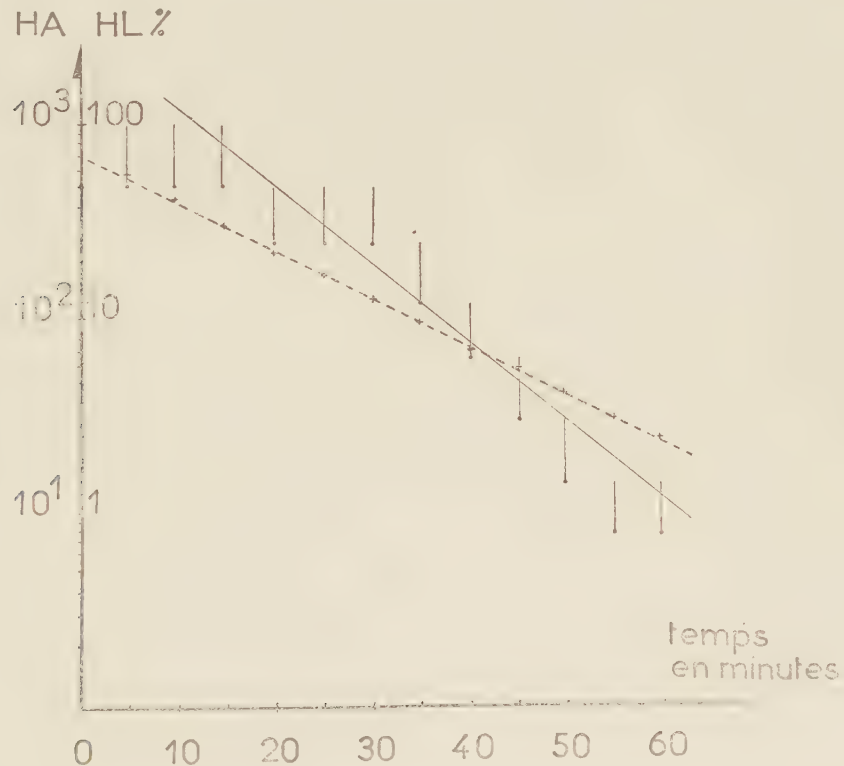


FIG. 8I - Cinétique d'inactivation des propriétés hémagglutinante (— HA, en unités Hirst) et hémolytique (x----x HL, en pourcentage d'hémolyse) de M. parainfluenzae I à la température de + 45°C, en ordonnées, titres HA et HL en échelle logarithmique.

Dans le cas de l'activité neuraminidasique, la dénaturation est linéaire (fig. 82).

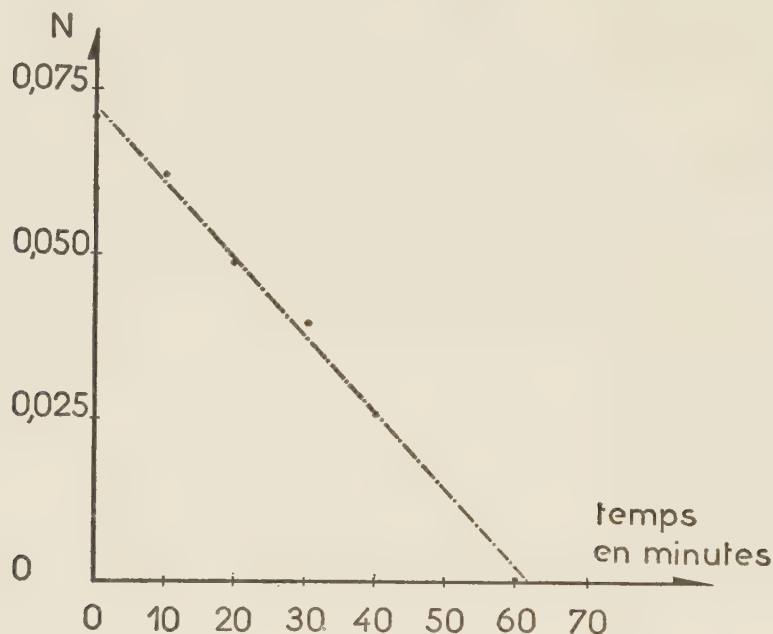


FIG. 82 - Cinétique de l'inactivation de la propriété neuraminidasique de M. parainfluenzae I à la température de + 45°C, en ordonnées, unités conventionnelles neuraminidasiques.

* *
*

L'étude des cinétiques d'inactivation à la température de + 45°C des propriétés hémagglutinante, hémolytique et neuraminidasique de la souche 52 de Myxovirus parainfluenzae I, permet de conclure à l'existence de supports différents, mais nous n'avons pu déterminer une température où l'une de ces propriétés serait conservée électivement, car la sensibilité des méthodes de titrage n'est pas superposable.

	Temps de contact (en mn)	+ 30°C	+ 35°C	+ 40°C	+ 45°C	+ 50°C	+ 55°C	+ 60°C
Unités HA	30	320	320	256	40	0	0	0
	60	320	320	160	0	0	0	0
	90	320	320	128	0	0	0	0
% HL	30	80	80	77	16	6	1	0
	60	80	79	59	5	5	0	0
	90	78	80	52	4	1	0	0
Unités N	30	0,0300	0,0300	0,0300	0,0200	0	0	0
	60	0,0300	0,0300	0,0260	0,0100	0	0	0
	90	0,0300	0,0300	0,0260	0,0060	0	0	0

Tableau XLIV - Mesure des propriétés hémagglutinante, hémolytique et neuraminidasique de Mixovirus parainfluenzae I en fonction de la température et pour des temps de contact de 30,60 et 90 minutes.

IV - EFFET DE LA DIALYSE

On prend deux souches de Myxovirus parainfluenzae I, la souche Sendaï 52 et une souche provenant de l'Institut Pasteur de Paris. On dialyse * les liquides allantoïques infectés, contre de l'eau bidistillée ou contre une solution tamponnée à pH 7,2 pendant deux fois vingt-quatre heures, à la température de + 4°C.

Les titres hémagglutinants sont conservés et les cinétiques d'hémolyse sont très voisines (fig. 83) de même que les pentes des activités neuraminidasiques.

Les supports des activités hémagglutinante, hémolytique et neuraminidasique ne sont pas dialysables, ce qui se confirme après une concentration du liquide de dialyse en eau bidistillée par lyophilisation. Aucune activité n'est alors retrouvée.

Certains auteurs tels que Morgan (344), Neurath (253), ont pensé que le titre hémolytique plus élevé, obtenu après concentration par ultracentrifugation ou par dialyse pouvait être dû à la libération d'un inhibiteur. Nous l'avons recherché en mettant en contact le culot avec des doses croissantes de surnageant, mais sans résultat positif (tableau XLV).

* boyaux NOJAX 30, (rayon du pore, environ 24 Å), Société SOPHYC ; 4, rue du Docteur Dumont, Levallois (Seine).

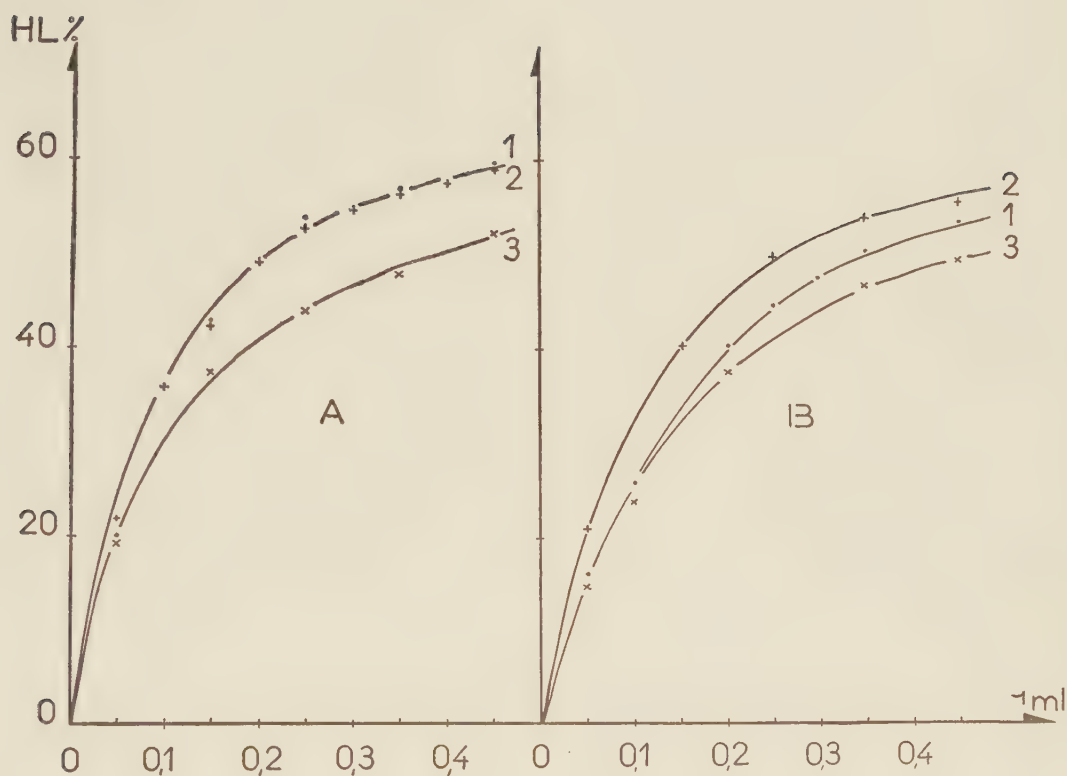


FIG. 83 - Action de la dialyse sur l'activité hémolytique du virus Sendai (A, souche 52 de l' "Américan Type culture Collection", B, souche de l'Institut Pasteur de Paris),

en abscisse, quantité de virus en ml,

en ordonnée, pourcentage d'hémolyse,

courbe 1, avant dialyse,

courbe 2, après dialyse contre de l'eau distillée,

courbe 3, après dialyse contre une solution tamponnée.

G.R à I %	Culot d'ultracentrifugation	Solution tamponnée.	Surnageant	% HL
4,5	0,25	0,25	0	78
4,5	0,25	0,15	0,10	78
4,5	0,25	0,10	0,15	78
4,5	0,25	0,05	0,20	78
4,5	0,25	0	0,25	78

Tableau XLV - Pourcentage d'hémolyse obtenu en mettant en contact des quantités croissantes de surnageant d'ultracentrifugation d'une suspension de Myxovirus parainfluenzae I avec une quantité fixe de culot de centrifugation.

V - ACTION DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET

On utilise une rampe à ultraviolet germicide *. Des boîtes de Pétri contenant 5 ml de suspension virale sont placées, découvertes, à une distance de 20 cm des tubes, et soumises à l'irradiation. Des échantillons sont prélevés et titrés toutes les cinq minutes pour rechercher l'action de ce rayonnement sur les différentes propriétés de la particule virale.

La figure 84 montre la diminution très rapide en fonction du temps des activités hémolytique et neuraminidasique, tandis que le titre hémagglutinant reste constant.

* lampe MAZDA T.G.25, 2537 Å.

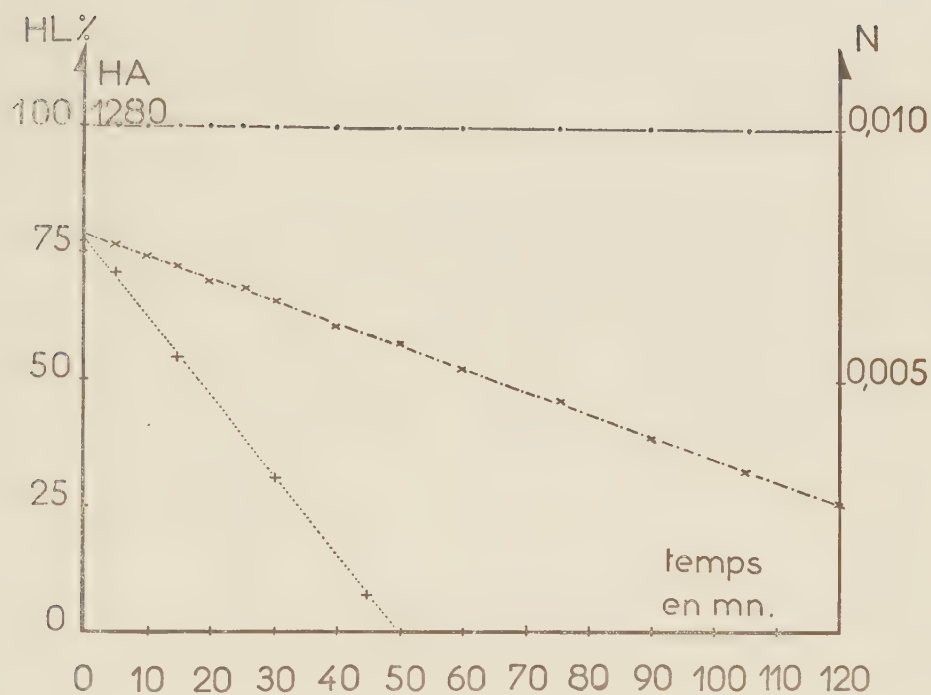


FIG. 84 - Etude de l'action du rayonnement ultraviolet sur les propriétés hémagglutinante (..... HA, en unités Hirst) hémolytique (x-----x HL, en pourcentage d'hémolyse) et neuraminidasique (+-----+, N, en unités conventionnelles) de Myxovirus parainfluenzae I.

VI - ACTION DU METHANOL

La méthode de purification de Myxovirus parainfluenzae I à l'aide du méthanol qui précipite les particules virales conduit habituellement à l'isolement d'une suspension douée de propriétés hémagglutinante et neuraminidasique dont les titres correspondent respectivement à ceux que donnent les rapports de concentration. En revanche, cette suspension virale a perdu toute activité hémolytique.

On connaît la facilité avec laquelle le méthanol donne le formaldéhyde en présence d'oxygène, aussi doit-on préalablement purifier ce méthanol en atmosphère d'azote *. Le distillat est conservé à la température de - 20°C.

L'absence de formaldéhyde est contrôlée par l'épreuve à l'acide chromatropique **.

* A 1 litre d'alcool méthylique, on ajoute 10 g de magnésium pur. La réaction s'accélère jusqu'à ébullition du liquide. Lorsque le métal a disparu, on maintient l'ébullition pendant quelques heures puis on distille, dans un courant d'azote, en rejetant la première fraction. La correction à appliquer au point d'ébullition observé est donnée par la formule de Craft.

$$\Delta t = C. (273 + t) \cdot (760 - p)$$

où t est le point d'ébullition observé à la pression p en millimètres de mercure, Δt , la correction à appliquer à ce point d'ébullition, et C, une constante pratiquement identique pour toutes les substances et égale à 0,00012.

** 1 g d'acide chromatropique est dissous dans 100 ml d'eau bidistillée. On filtre sur papier, puis le filtrat est recueilli dans un flacon de 500 ml que l'on complète en versant lentement une solution d'acide sulfurique, préalablement refroidie (2 vol. $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$, 1 vol. eau distillée). On ajoute 1 ml de prise d'essai à 9 ml de cette solution et, après 30 minutes d'ébullition, on mesure l'intensité de la coloration rose à la longueur d'onde de 570m μ .

Pour rechercher les conditions d'action du méthanol sur le principe hémolytique, on met en présence une suspension virale, équilibrée à la température de + 4°C et de l'alcool méthylique refroidi, à concentration croissante. Après une heure de contact à cette température, le degré d'hémolyse est mesuré à l'aide de la méthode que nous avons décrite dans notre chapitre septième (Ière partie), en versant directement 4,5 ml d'une suspension d'hématies 0 Rh+ à 1 %, préalablement réchauffée à la température de + 37°C, sur 0,5 ml du mélange précédent.

Le tableau XLVI montre que le pouvoir hémolytique disparaît lorsque la concentration en méthanol atteint 30%.

Composants de la réaction à 0° C	Concentration en méthanol	% d'hémolyse après 1 h de contact.
0,35 ml de virus + 0,15 ml méthanol	30 %	0
0,70 ml de virus + 0,30 ml méthanol	30 %	0
0,40 ml de virus + 0,10 ml méthanol	20 %	77
0,80 ml de virus + 0,20 ml méthanol	20 %	77
0,90 ml de virus + 0,10 ml méthanol	10 %	90
témoin virus	0 %	90

Tableau XLVI - Pourcentage d'hémolyse obtenu par Myxovirus parainfluenzae I en fonction de la concentration en méthanol, pour un temps de contact de une heure à la température de 0°C.

On recommence l'expérience, mais en portant cette fois le mélange constitué par le méthanol à différentes concentrations et la suspension virale, à la température de + 37°C pendant cinq minutes. On observe la disparition de l'activité hémolytique pour des concentrations en méthanol de 30 % et de 20 % et une destruction partielle lorsque la concentration est limitée à 10 % (tableau XLVII).

Devant ces résultats, on recherche l'action du méthanol à la concentration de 30 %, d'une part avec le mélange maintenu à la température de 0°C pendant des temps variables avant l'addition de la suspension d'hématies, d'autre part après avoir réchauffé le mélange à la température de + 37°C pendant cinq minutes. Comme l'indique le tableau XLVIII le pouvoir hémolytique disparaît totalement après passage du mélange à la température de + 37°C pendant quelques minutes, alors que la diminution du degré d'hémolyse est progressive et d'autant plus importante que le temps de contact est plus grand lorsque le mélange est resté à la température de 0°C.

A la température du laboratoire, le méthanol employé à la concentration de 30 % fait disparaître le pouvoir hémolytique en quelques minutes (tableau XLIX).

Pour tenter de localiser le principe hémolytique après précipitation des particules par le méthanol employé à des concentrations inférieures à 30 % afin que la destruction du pouvoir hémolytique ne soit pas complète, on centrifuge le mélange après une heure de contact à 0°C à 105 000 g pendant deux heures. Le tableau L montre qu'avec les concentrations en méthanol de 20 et de 25 %, on retrouve le pouvoir hémolytique dans le culot alors que le surnageant en est dépourvu.

Si l'ultracentrifugation est moins poussée, ou si le temps de sédimentation est plus court, on retrouve une partie du pouvoir hémolytique dans le surnageant, mais la positivité de l'épreuve d'hémagglutination élimine l'hypothèse d'un principe hémolytique isolé non sédimentable à ces fortes accélérations.

Composants de la réaction placés à + 37°C pendant 5 minutes	Concentration en méthanol	% d'hémolyse
0,35 ml virus + 0,15 ml méthanol	30 %	0
0,70 ml virus + 0,30 ml "	30 %	0
0,40 ml virus + 0,10 ml "	20 %	0
0,80 ml virus + 0,20 ml "	20 %	I
0,90 ml virus + 0,10 ml "	10 %	67
témoin virus	0 %	90

Tableau XLVII - Pourcentage d'hémolyse obtenu par Myxovirus parainfluenzae I en fonction de la concentration en méthanol, pour un temps de contact de cinq minutes à la température de + 37°C.

temps de contact méthanol - virus (en minutes)	% HL sans réchauffement du mélange	% HL après réchauffement du mélange à + 37°C.
I	73	0
5	70	0
10	66	0
15	64	0
30	61	0
60	50	0

Tableau XLVIII - Comparaison entre les pourcentages d'hémolyse obtenus par Myxovirus parainfluenzae I pour des temps de contact variables, d'une part lorsque le mélange virus-méthanol est maintenu à la température de 0°C, d'autre part, lorsqu'un mélange identique est porté quelques minutes à + 37°C.

A la température de 0°C, l'activité hémolytique de Myxovirus parainfluenzae I est détruite par l'alcool méthylique redistillé lorsque sa concentration atteint 30 % du mélange total.

A la température de + 37°C, cette inactivation est quasi instantanée, même pour de faibles concentrations, ce qui permet de penser que le méthanol agit directement en dénaturant le principe hémolytique qui pourrait être de nature protéinique ou lipoprotéinique, ou indirectement, en libérant du formaldéhyde.

VII - ACTION DU FORMALDEHYDE

Devant la destruction plus rapide du pouvoir hémolytique par le méthanol qui n'a pas été fraîchement redistillé et qui contient du formol mis en évidence par l'épreuve de l'acide chromotropique ou par cyanoiodométrie, on recherche l'action du formaldéhyde * en fonction de sa concentration, après un temps de contact de 1 heure à la température du laboratoire. Le tableau LI montre la destruction totale de l'activité hémolytique pour une concentration au 1/10 ème et une destruction partielle pour une concentration au 1/100 ème.

Si on suit la cinétique d'inactivation des principes hémagglutinant, hémolytique et neuraminidasique par le formol employé à la concentration au 1/20 ème, on remarque (fig. 85) la conservation du pouvoir hémagglutinant après 60 minutes de contact tandis que les principes hémolytique et neuraminidasique sont détruits ou diminués après un temps de 45 minutes

*

*

*

* formaldéhyde " Merck".

Composants de la réaction à la température de + 20°C.	Concentration en méthanol	Temps de contact	% HL
0,35 ml virus + 0,15 ml méthanol	30 %	0	38
- id. -	30 %	1 mn	18
- id. -	30 %	2 mn	7
0,40 ml virus + 0,10 ml méthanol	20 %	0	91
- id. -	20 %	1 mn	87
- id. -	20 %	2 mn	57
- id. -	20 %	5 mn	25
Témoin virus	0 %		94

Tableau XLIX - Pourcentage d'hémolyse obtenu par Myxovirus parainfluenzae I en fonction de la concentration en méthanol, pour une température de + 20°C et pour des temps de contact différents.

Concentration finale en méthanol	Avant		Après centrifugation			
	centrifugation		culot		surnageant	
	Unités HA	% HL	HA	% HL	HA	% HL
30 %	320	0	2560	0	0	0
25 %	320	35	2560	15	0	0
20 %	320	65	2560	30	0	0
0 %	320	70	2560	60	0	0

Tableau L - Comparaison entre les titres hémagglutinant et hémolytique du culot et du surnageant d'ultracentrifugation, d'une suspension de Myxovirus parainfluenzae I pour des concentrations variables en méthanol.

Pour Csonka et Koch (345) la sensibilité moins grande à l'action du formol du support de la propriété hémagglutinante par rapport au support des propriétés antigéniques serait une preuve en faveur de la nature polysidique de l'hémagglutinine.

1er temps de la réaction, 1 h de contact à la température du laboratoire.	2ème temps de la réaction, % HL après addition de 4,5 ml GR I % à + 37°C.
0,25 ml virus + 0,25 ml tampon pH 7,2	78
" + 0,25 ml tampon + 0,25 ml formol	0
" + 0,20 ml tampon + 0,05 ml formol au I/1000 ème	78
" + 0,20 ml tampon + 0,05 ml formol au I/100 ème	72
" + 0,20 ml tampon + 0,05 ml formol au I/10ème	24
" + 0,20 ml tampon + 0,05 ml formol	0
" + 0,15 ml tampon + 0,10 ml formol	0

Tableau LI - Mesure de l'activité hémolytique (HL, en pourcentage d'hémolyse) pour des concentrations variables en formaldéhyde.

La recherche de l'action du formol sur les principes hémolytique, neuraminidasique et hémagglutinant de Myxovirus parainfluenzae I, montre une sensibilité plus grande des deux premiers, ce qui est en faveur de la nature protéinique de leur molécule support.

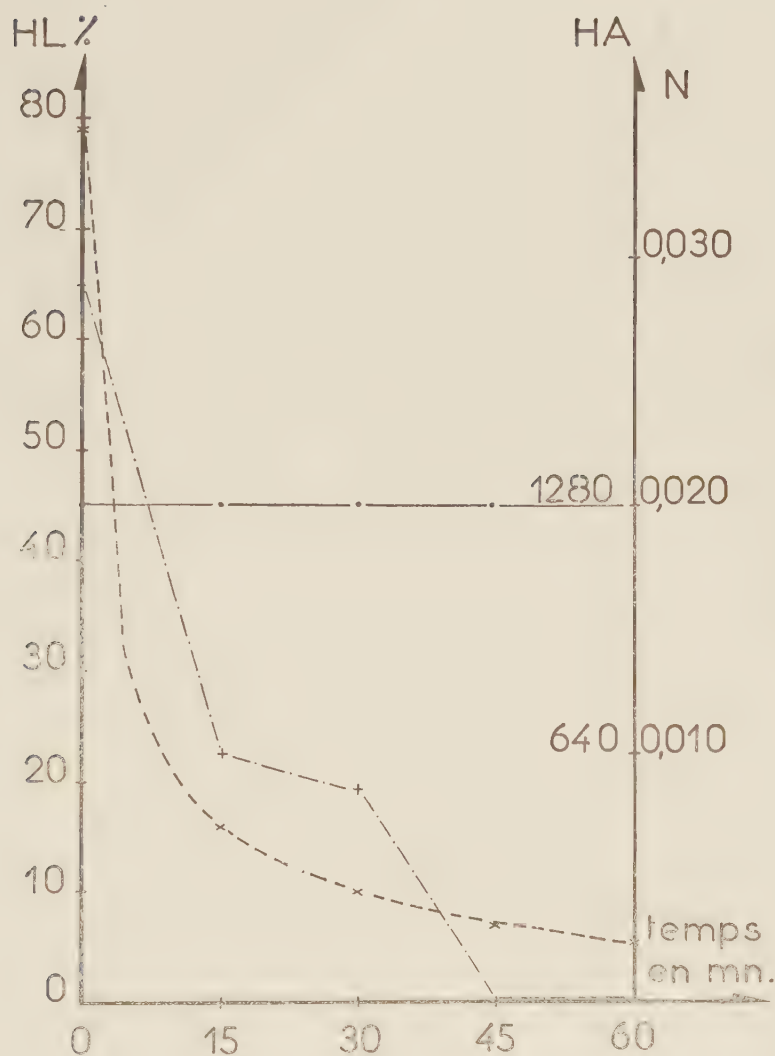


FIG. 85 - Cinétique d'inactivation des propriétés hémagglutinante (.—. HA, en unités Hirst), hémolytique (x-----x HL, en pourcentage d'hémolyse) et neuraminidasique (+—.—+ N, en unités conventionnelles) de Myxovirus parainfluenzae I, par le formaldéhyde à la concentration finale au I/200 ème,

VIII - ACTION DE L'ETHER

La désintégration de la particule virale par l'éther déperoxydé suivant la méthode de Lief et Henlé (108) permet de séparer l'hémagglutinine de l'antigène S, ce dernier étant principalement constitué par de l'acide nucléique, comme Blaskovic (110) l'a montré par l'absorption à 2600 Å. Andrews et Horstmann (346) ont été les premiers à utiliser la susceptibilité à l'éther comme moyen de classification des virus. Davenport, Rott et Schäfer (347) ont repris ce procédé pour placer le virus de la peste aviaire dans le groupe des virus grippaux, après une étude des caractères morphologiques et sérologiques de leurs sous-unités. Hosaka, Hosokawa et Fukai (348) ont obtenu une désintégration encore plus complète en ajoutant à l'éther des quantités variables d'Emasol II30, produit voisin du tween 20.

Enfin ces mêmes auteurs (349) ont utilisé l'éther pour dissocier Myxovirus parainfluenzae I et mettre en évidence, à l'aide de la méthode de diffusion sur gel, trois antigènes différents : R, qui serait associé à l'hémagglutinine et qui diffuse rapidement, S, qui représenterait l'AgS, et H, l'hémagglutinine.

Dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, si on recherche l'activité hémolytique après ce traitement par l'éther déperoxydé, on ne le retrouve pas dans la phase aqueuse. Or, la phase éthérée n'entraîne pas le principe responsable de l'hémolyse car nous en avons extrait les lipides par la méthode de Folch (283) puis séparé les principaux constituants sur colonne de chromatographie de silice, sans pouvoir mettre en évidence de lysophosphatides par chromatographie en couche mince, en supposant que le phénomène soit dû à une lysolécithine. Il faut donc admettre que le contact de la particule virale avec l'éther, dans les conditions nécessaires pour obtenir l'hémagglutinine, détruit le principe hémolytique.

Nous avons recherché l'action de l'éther déperoxydé de la manière suivante :

A 1 ml de suspension virale, hémagglutinante et hémolytique, soumise à une agitation constante, on ajoute des quantités variables d'éther déperoxydé pendant des temps de contact différents. Pour arrêter l'action de l'éther, on porte le tube réaction à la température de + 37°C, donc légèrement supérieure à celle de l'ébullition de l'éther (34°6) et on fait plonger un dispositif barboteur d'azote purifié pour activer l'évaporation. Le tableau suivant (LII) montre que lorsque le temps de contact est voisin de 0 (les gouttes calibrées d'éther tombent en même temps que le courant d'azote traverse la suspension) l'activité hémolytique est conservée. En revanche, il suffit de I goutte d'éther déperoxydé pendant un temps de contact de deux minutes pour que cette hémolyse soit abaissée et de II gouttes pour qu'elle disparaisse.

Tout au contraire, le pouvoir hémagglutinant s'élève considérablement.

	Contact 0				Contact I minute				Contact 2 minutes			
Quantité d'éther	0,05	0,10	0,15	0,20	0,05	0,10	0,15	0,20	0,05	0,10	0,15	0,20
U HA	640	640	1280	1280	320	2560	10240	10240	640	5120	5120	10240
% HL	55	54	56	56	56	0	0	0	12	0	0	0

Tableau LII - Mesure des activités hémagglutinante et hémolytique de Myxovirus parainfluenzae I en fonction de quantités variables d'éther déperoxydé et pour des temps de contact de 0 (les gouttes d'éther tombent en même temps que le courant d'azote traverse la suspension), I et 2 minutes.

Une expérience analogue, mais suivie pendant 25 minutes, avec recherche des trois propriétés hémagglutinante, hémolytique et neuramidase, conduit aux mêmes conclusions, avec en plus, une conservation

du titre neuraminidasique (fig. 86).

Pour Choppin et Stoeckenius (350), qui ont suivi au microscope électronique l'influence de l'éther sur l'enveloppe virale de Myxovirus influenzae A₂, la multiplicité des fragments est d'autant plus élevée que la durée du contact est plus grande.

Nous avons également observé ce phénomène avec Myxovirus parainfluenzae I.

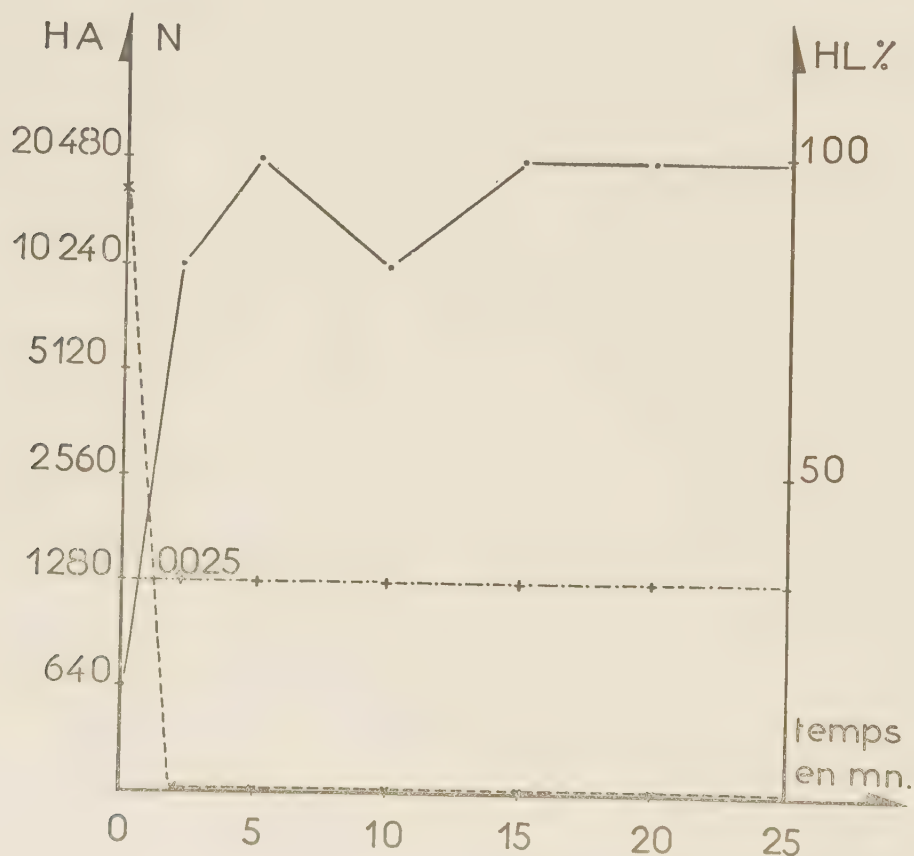


FIG. 86 - Effet de l'éther déperoxydé employé à la concentration finale au I/10ème sur les propriétés hémagglutinante (.—. HA, en unités Hirst), hémolytique (x----x HL, en pourcentage d'hémolyse) et neuraminidasique (+—.—+ N, en unités conventionnelles) de Myxovirus parainfluenzae I.

L'augmentation du pouvoir hémagglutinant peut être expliqué par une surface de contact plus grande puisque, d'après Chesbro et Hedrick (351,352), les hématies, après adsorption d'une particule virale, deviennent hydrophobes et ont tendance à se fixer par un phénomène de tension superficielle qui conduit à la formation du bouclier au fond des tubes à réactions. Quand à la disparition du pouvoir hémolytique, elle ne peut qu'être due à une réaction chimique et non à la désintégration, puisque celle-ci, obtenue aisément par des procédés physiques, élève considérablement le titre hémolytique.

IX - ACTION DES SELS BILIAIRES

Parmi les nombreux sels biliaires existants, le desoxycholate de soude a été le plus utilisé au cours des études de dénaturation des particules virales. C'est ainsi que Smith (353) en 1939, montra pour la première fois qu'une dilution de desoxycholate de soude au 1/1000 ème inactivait les virus de la grippe, du louping ill, du sarcome de Rous, mais qu'elle était sans action sur les virus de l'ectromélie et de la vaccine. Une année plus tard, Burnet et Lush (354) confirmèrent ces résultats, étendant l'effet de ce sel biliaire aux virus de l'herpès, de la maladie de Newcastle et du myxome tandis que Theiler (355) montrait en 1957 la résistance des virus Cocksackie, poliomyélitique et de l'encéphalite de la souris. Sunaga, Taylor et Henderson (356) comparant leur méthode d'inactivation à l'aide du desoxycholate de soude à celle de l'éther déperoxydé, trouvèrent des résultats superposables, ce qui leur permit d'appliquer la classification de Andrewes et Horstmann (346), établie d'après la sensibilité des particules virales à l'éther, à l'action du desoxycholate.

Grâce à ces deux procédés, Myxovirus influenzae A et B, les groupes sérologiques A, B et C des "Arthropod-borne viruses" étaient inactivés, tandis que trois souches de virus ECHO, trois souches d'adénovirus et deux virus Cocksackie résistaient aussi bien à l'action de l'éther dé-

peroxydé qu'à celle du desoxycholate de soude.

Pour Anderson et Ada (357), la dénaturation du principe infectieux serait due à la rupture de la coque protéinique de la particule virale suivie d'une inactivation de l'acide ribonucléique libéré, tandis que pour Laver (358, 359), la structure quaternaire seule des protéines serait détruite. Enfin, ce même auteur (360) montra que si le pouvoir infectieux de Myxovirus influenzae B (souche Lee) était supprimé par le desoxycholate de soude, en revanche, l'activité neuraminidasique ne subissait aucune variation et le titre hémagglutinant était augmenté d'environ 45 fois lorsqu'on utilisait les hématies de pigeon.

Dans ce chapitre, nous avons voulu étudier l'action des trois sels biliaires, le desoxycholate, le glycocholate et le taurocholate de soude sur Myxovirus parainfluenzae I pour suivre l'évolution des activités hémagglutinante, hémolytique et neuraminidasique, soit en fonction de la concentration en sels biliaires, soit en fonction du temps de contact entre le sel biliaire et la suspension virale pour tenter de séparer les propriétés biologiques.

A - DESOXYCHOLATE DE SOUDE -

On prépare une solution de desoxycholate de soude * à 10 p. 100 en milieu isotonique tamponné à pH 7,2, stérilisée par passage sur membrane filtrante Co 5. Dans un premier temps, on recherche l'action de ce sel biliaire sur les propriétés virales en mettant en contact pendant 30 minutes à la température de 0°C, 0,9 ml d'une suspension de Myxovirus parainfluenzae I avec 0,1 ml de desoxycholate de soude à des concentrations variant de 1 à 10 p. 100. Le dosage précis de ces concentrations a été effectué par la méthode phosphovanillique **. L'activité hémolytique est titrée sur 0,2 ml de

* desoxycholate de soude " Merck ".

** On mélange 0,2 ml d'échantillon avec 0,1 ml de réactif constitué par une solution de vanilline à 25 p. 100 dans l'éthanol et avec 3 ml d'acide phosphorique à 85 p. 100. Après une ébullition de 5 mn suivie d'un refroidissement du mélange, on mesure la densité optique de la coloration à 580 mμ.

mélange par la méthode habituelle.

On obtient une courbe (fig.87) composée de quatre régions caractéristiques :

- A, où l'activité hémolytique virale est augmentée,
- B, où la destruction de l'hémolysine, en fonction des concentrations finales de desoxycholate de soude comprises entre 0,2 et 0,3 p. 100, est représentée par un segment de droite de pente très accentuée,
- C, où l'activité hémolytique virale est entièrement détruite,
- D, où le desoxycholate de soude est lui-même hémolytique pour des concentrations finales supérieures à 0,5 p. 100.

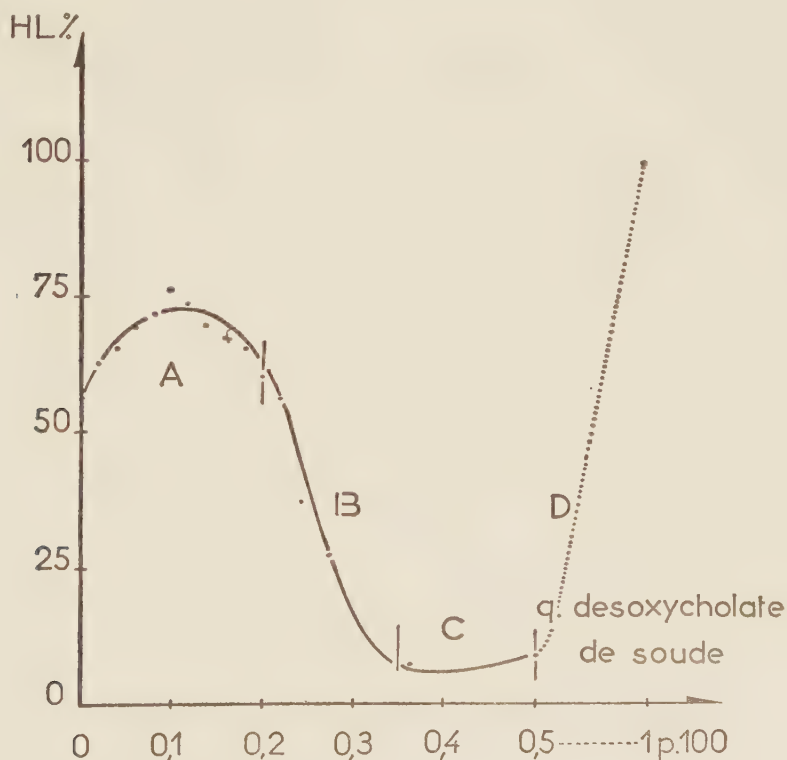


FIG. 87 - Courbe d'hémolyse d'un mélange Myxovirus parainfluenzae - desoxycholate de soude, en fonction de la concentration de ce dernier, pour un temps de contact de 30 minutes, à la température de 0°C.

La recherche parallèle de l'activité hémagglutinante est toujours positive, avec conservation du titre (80 unités Hirst) pour les faibles concentrations en sel biliaire, mais avec une augmentation de ce titre jusqu'à 640 unités Hirst pour des concentrations élevées.

L'ultracentrifugation à 28 000 tours par minute pendant trois heures, d'un lot de virus Sendai réparti en trois fractions traitées respectivement par des solutions de desoxycholate de soude à 0,6, 2,5 et 10 p.100, conduit à la suppression de l'activité hémolytique du culot lorsque la concentration finale de desoxycholate est égale ou supérieure à 0,25 P.100. La conservation de cette propriété dans le surnageant III est due exclusivement au sel biliaire qui n'a pas sédimenté (tableau LIII).

Dans un second temps, on recherche la cinétique d'inactivation des propriétés biologiques en présence d'une solution de desoxycholate de soude employée à la concentration finale de 0,375 p.100; c'est à-dire à la concentration que nous avons déterminée comme étant celle qui détruisait totalement l'activité hémolytique spécifique.

La figure 88 montre que l'hémolysine est inactivée après 10 minutes de contact alors que les propriétés hémagglutinante et neuraminidase sont conservées. Dans cette expérience, la réaction d'hémolyse a été effectuée dans des conditions légèrement différentes, à savoir une prise d'essai de 0,4 ml et un temps d'hémolyse de 17 minutes correspondant à la partie exponentielle de la courbe qui traduit le phénomène hémolytique donc au maximum de sensibilité de l'épreuve.

B - GLYCOCHOLATE DE SOUDE.

Après avoir préparé une solution stérile de glycocholate de soude à 10 p.100, on met en contact, à la température de + 37°C, pendant

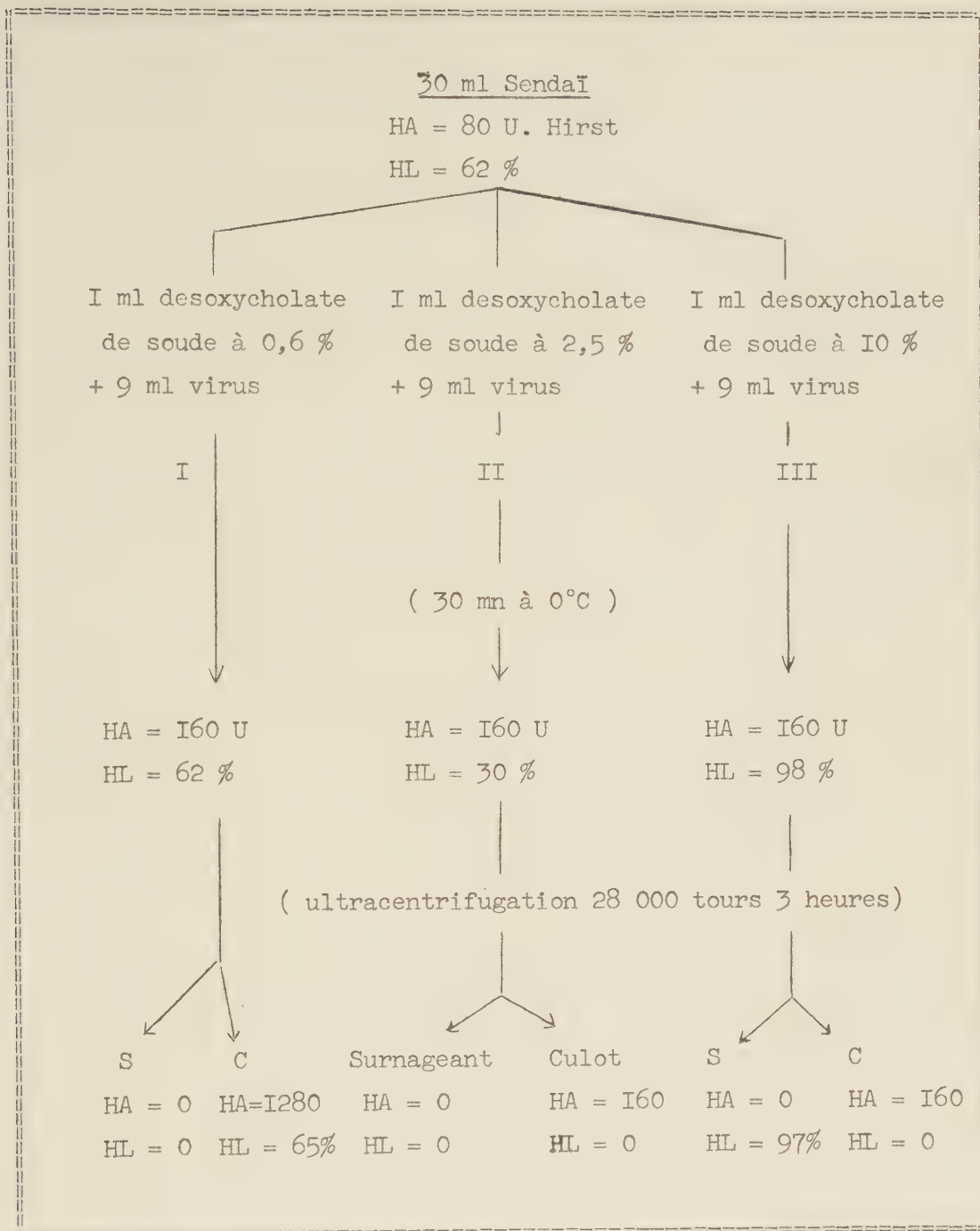


Tableau LIIII - Recherche des activités hémagglutinante et hémolytique sur les surnageants et les culots d'ultracentrifugation de trois fractions (d'un même lot de virus Sendaï) traitées par des concentrations différentes de desoxycholate de soude.

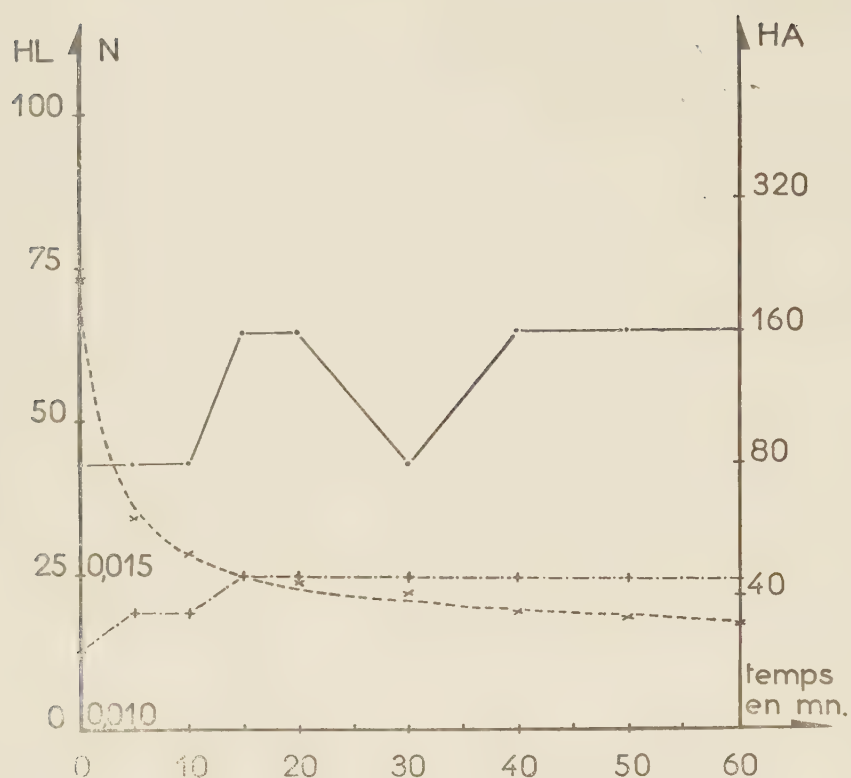


FIG. 88 - Effet d'une solution de desoxycholate de soude employée à la concentration finale de 0,375 p.100, sur les propriétés hémagglutinante (.——. HA en unités Hirst), hémolitique (x——x HL en pourcentage d'hémolyse) et neuraminidasique (+—.—+ N en unités conventionnelles) de Myxovirus parainfluenzae I.

trente minutes, 0,9 ml d'une suspension de Myxovirus parainfluenzae I avec 0,1 ml de glycocholate de soude dont la concentration varie de 1 à 10 p.100. On bloque la réaction dans un bain d'eau glacée puis on recherche le pourcentage d'hémolyse provoquée par chaque prélèvement.

La figure 89 (G) montre que l'activité hémolitique est détruite pour des concentrations finales supérieures à 0,5 p.100. En revanche, la propriété hémagglutinante ne subit aucun changement.

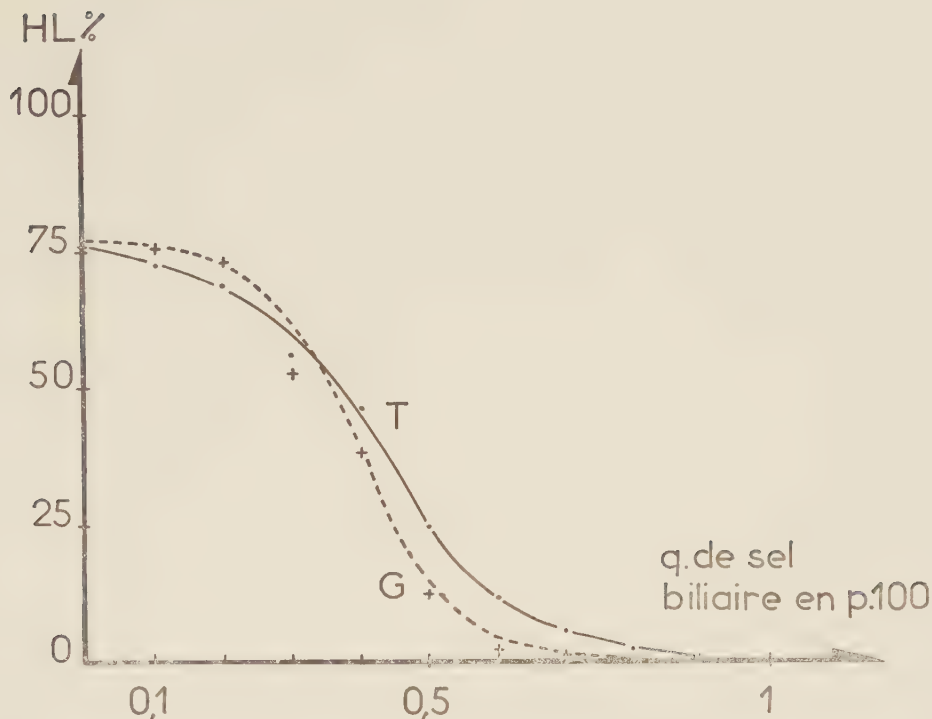


FIG. 89 - Courbe d'hémolyse d'un mélange Myxovirus parainfluenzae I - taurocholate (T) ou glycocholate de soude (G), en fonction de la concentration en sels biliaires, pour un temps de contact de 30 minutes à la température de + 37°C.

La cinétique d'inactivation du principe hémolytique à l'aide d'une solution de glycocholate de soude à la concentration finale de 0,5 p. 100, concentration déduite de la sigmoïde précédente, est de type exponentiel négatif alors que les propriétés hémagglutinante et neuraminidasique sont conservées pendant les quatre-vingt dix minutes d'expérience (fig. 90 G).

C - TAUROCHOLATE DE SOUDE.

La répétition de ces expériences, dans les mêmes conditions de température et de concentration, mais avec une solution stérile de taurochola-

te de soude, conduit à des résultats superposables (figures 89 -T et 90 -T).

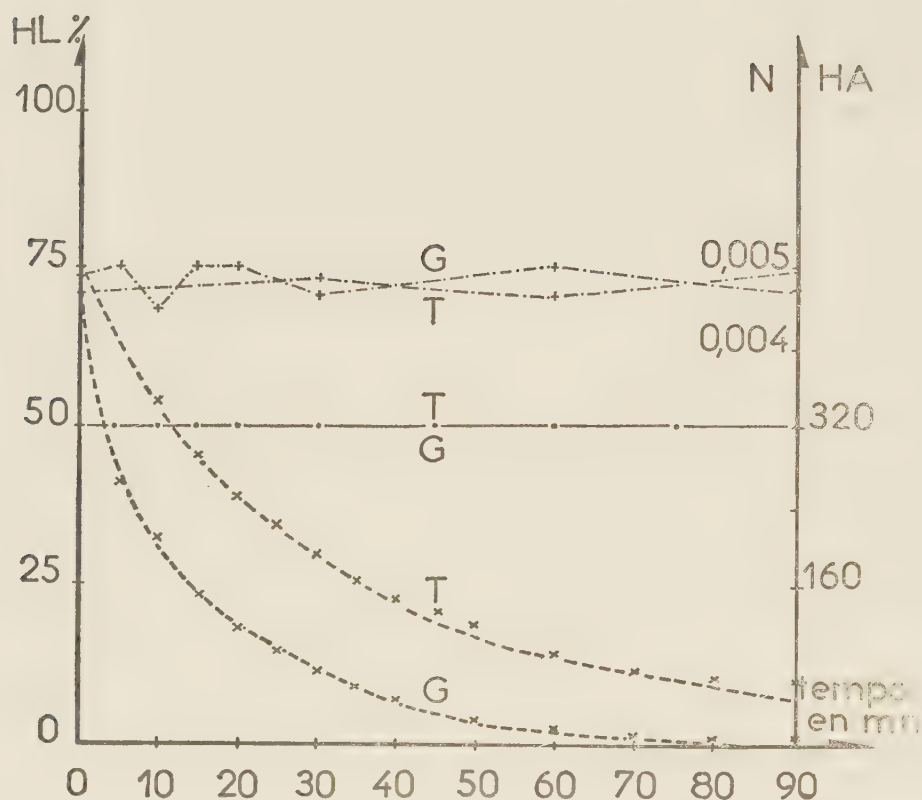


FIG. 90 - Effet des solutions de taurocholate de soude (T) et de glycocholate de soude (G) employées à la concentration finale de 0,5 p.100, sur les propriétés hémagglutinante (..... HA en unités Hirst), hémolytique (x.....x HL en pourcentage d'hémolyse) et neuraminidasique (+.....+ N en unités conventionnelles) de Myxovirus parainfluenzae I.

*
* *

Laver (361) a montré, avec Myxovirus Influenzae B que le desoxycholate de soude dissociait la particule virale en sous-unités de cons-

tantes de sédimentation 28 S, 10 S, 8 S et 0,8 S. Dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, ce traitement est également suivi d'une rupture du virion et la recherche des propriétés biologiques nous montre la conservation des activités hémagglutinante et neuraminidasique et une disparition rapide du principe hémolytique pour des concentrations finales de desoxycholate de soude voisines de 0,5 p.100. Pour des concentrations supérieures, l'action hémolytique propre de ce sel biliaire empêche toute étude de l'hémolyse virale spécifique. Ce phénomène peut être généralisé aux autres sels biliaires.

X - DISCUSSION

Le tableau récapitulatif (tableau LIV) de l'action des différents traitements physiques ou chimiques sur les propriétés biologiques de Myxovirus parainfluenzae I met en évidence l'extrême sensibilité du support de l'activité hémolytique vis-à-vis de l'éther déperoxydé, des sels biliaires, du méthanol ou, plus simplement lorsque le liquide allantique est conservé à la température de - 10°C à l'état de surfusion, procédés qui ne détruisent pas les propriétés hémagglutinante et neuraminidasique.

La perte de l'activité hémolytique, accompagnée chaque fois de la disparition du pouvoir infectieux, semble donc la première étape dans la dénaturation de la particule virale.

Le traitement par l'éther déperoxydé ou par les sels biliaires montrant au microscope électronique la dissociation des virions en sous-unités, on pouvait penser que l'intégrité de la particule était nécessaire pour que les propriétés hémolytique et infectieuse soient conservées.

Cependant, l'étude comparative de ces mêmes sous-unités, libérées par des procédés physiques tels que le broyage, la congélation à la température de - 196°C suivie de décongélation à +37°C, n'est pas en faveur de cette hypothèse puisque l'activité hémolytique est conservée et le

plus souvent augmentée.

On peut admettre au contraire que cette propriété, répartie uniformément sur la coque virale, se retrouve sur chaque fragment libéré, de telle manière qu'après fixation de ce fragment sur l'hématie à la température de + 4°C, l'hémolyse se produit lorsqu'on élève la température à + 37°C.

La destruction par l'éther, pouvant être facilement reproduite par d'autres solvants des lipides tels que le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le benzène, les mélanges chloroforme - méthanol, on peut penser que le support du principe hémolytique doit contenir des substances lipidiques dans sa molécule pour que puisse se manifester son activité.

L'action du méthanol est complexe. Tous les auteurs ont remarqué la disparition de l'hémolysine au cours de la première étape de la purification d'une suspension de Nyctovirus parainfluenzae I par précipitation méthanolique. En revanche, si on effectue cette expérience, non plus à la température de + 4°C, comme il est classique de la faire, mais à des températures plus basses, voisines de - 5°C, avec ultracentrifugation différentielle à cette température, on est surpris de constater que l'activité hémolytique se retrouve cette fois dans le culot de sédimentation, accompagnant les propriétés hémagglutinante et neuraminidasique.

Le méthanol, employé à de fortes concentrations et à des températures supérieures à 0°C, pourrait ainsi supprimer l'activité hémolytique soit par extraction des lipides de son support, soit en libérant du formaldéhyde qui dénaturerait une protéine, second maillon probable de la molécule d'hémolysine, hypothèse déjà envisagée après action de la trypsine et qui se confirme après irradiation ultraviolette.

Les cinétiques d'inactivation thermique montrent d'une part que les supports sont différents puisque les pentes ne sont pas superposées.

Traitement physique ou chimique	HA	HL	N	I
Surfusion à - 10°C	Ct	0	Ct	
Congélation à - 70°C	Ct	++	Ct	Ct
Congélation à - 196°C	+	+++	Ct	Ct
Broyage	++	+++	Ct	Ct
Température + 45°C	0	0	0	
Dialyse	Ct	Ct	Ct	
Rayonnement ultraviolet	Ct	0	0	0
Méthanol	Ct	0	Ct	0
Formaldéhyde	Ct	0	0	
Ether déperoxydé	+++	0	Ct	0
Desoxycholate de soude	Ct	0	Ct	0
Glycocholate de soude	Ct	0	Ct	0
Taurocholate de soude	Ct	0	Ct	0
Trypsine	Ct	0	0	

Tableau LIV - Tableau récapitulatif de l'action des différents traitements physiques ou chimiques sur les propriétés biologiques (hémagglutinante HA, hémolytique HL, neuraminidasique N et infectieuse I) de Myxovirus parainfluenzae I.

Ct, conservation; 0, disparition ; +, élévation du titre de l'activité biologique.

bles et, d'autre part que l'activité hémolytique ne peut être rapportée à un lysophosphatide, la thermosensibilité de ce dernier ayant été mise en évidence dans un précédent chapitre.

Les résultats donnés par la dialyse, permettent de penser que les supports responsables de ces propriétés biologiques sont de grosses molécules ne traversant pas les parois du sac et que la présence d'ions inhibiteurs ne peut être retenue.

L'état de surfusion dans lequel le liquide allantoïque infecté peut être maintenu à la température de -10°C , inactive parallèlement les principes hémolytique et infectieux, tout en respectant les activités hémagglutinante et neuraminidasique. L'inoculation d'une suspension virale conservée quarante-huit heures à cette température, à des oeufs embryonnés de neuf jours, montre qu'il existe une certaine relation entre les activités hémolytique et infectieuse dans la transmission de l'infection, puisque le degré d'hémolyse du liquide récolté est très faible.

L'étude des rapports possibles entre les supports des propriétés biologiques de Myxovirus parainfluenzae I, par l'action de différents traitements physiques ou chimiques, nous conduit ainsi à les séparer dans l'ordre décroissant de leur sensibilité vis-à-vis de ces agents extérieurs:

pouvoir infectieux et hémolysine, puis neuraminidase et enfin hémagglutinine.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION GENERALE

ET

CONCLUSIONS

DISCUSSION GENERALE

On admet ordinairement que l'hémagglutination résulte de la fixation de la particule virale sur le récepteur mucopolysaccharidique de l'hématie ce qui est un phénomène indépendant de la température. Quand celle ci est suffisamment élevée, l' α -cétoglucosidase localisée dans l'enveloppe externe du virion, détache l'acide sialique terminal du récepteur, en provoquant la libération de la particule au sein du milieu. Dans le cas particulier de Myxovirus parainfluenzae I, lorsque certaines conditions de pH et de température sont réalisées, ce phénomène s'accompagne d'une modification de la perméabilité de la membrane érythrocytaire qui aboutit à l'hémolyse.

Ce schéma classique présentant de nombreuses inconnues, tant du point de vue de l'existence ou de la non-existence d'une interrelation entre les propriétés biologiques du virus que de celui de la nature des molécules supportant ces activités et de la localisation de ces derniers dans l'architecture du virus, nous nous sommes proposés de les étudier.

Comme nous avons observé par l'étude des rapports entre les propriétés biologiques au cours du développement de Myxovirus parainfluenzae I sur l'embryon de poulet, que la particule virale est apparemment identique à elle-même pendant toute la durée du cycle de l'infection, nous avons entrepris de dissocier les éléments de structure constitutifs du virion afin d'identifier parmi eux ceux qui supportent les propriétés biologiques.

LE SUPPORT DE L'ACTIVITE HEMAGGLUTINANTE.

L'activité hémagglutinante de Myxovirus parainfluenzae I, cultivé sur embryons de poulet, mesurée à l'aide de la méthode de Hirst apparaît entre la 12ème et la 24ème heure d'incubation à la température de + 35°C et pour une humidité relative de 90 p.100.

Cette propriété est caractérisée à la fois par une grande résistance vis-à-vis des facteurs physiques tels que le broyage, la congélation suivie de décongélation, le rayonnement ultraviolet et vis-à-vis d'agents chimiques tels que le méthanol, l'isopropanol, le formol, l'éther déperoxydé, la trypsine, les sels biliaires, facteurs qui, en revanche, inactivent plus ou moins les autres propriétés biologiques.

L'augmentation du titre hémagglutinant jusqu'à un certain taux limite, que l'on constate après dissociation des virions à l'aide de l'éther déperoxydé, du desoxycholate de soude, du broyage ou de la congélation à la température de -196°C suivie d'une décongélation brutale à $+37^{\circ}\text{C}$, permet de penser que l'activité hémagglutinante est supportée exclusivement par l'enveloppe externe que tous ces procédés dissocient en sous-unités de 30 m μ de diamètre. Chacune de ces sous-unités serait l'élément de structure supportant cette propriété.

Il reste à savoir si cette sous-unité de structure s'identifie à l'hémagglutinine ou si elle est formée d'espèces chimiques distinctes dont seulement l'une d'elles posséderait le pouvoir de provoquer l'hémagglutination.

La nature de la molécule responsable de l'activité hémagglutinante peut être déduite de notre étude.

Lorsqu'en suivant la méthode préconisée par Hoyie (106), on dissocie la particule virale par extraction des lipides dans l'éther, on retrouve dans la phase aqueuse l'antigène spécifique de type (antigène S) et une substance responsable de l'hémagglutination. Celle-ci est habituellement appelée "hémagglutinine", et il est facile de la séparer de l'antigène S par adsorption sur hématies à la température de $+4^{\circ}\text{C}$ suivie d'une élution obtenue par élévation de la température de la suspension à $+37^{\circ}\text{C}$. En réalité, nous avons montré que cette "hémagglutinine" supporte également l'activité neuraminidasique.

Le spectre infrarouge de cette "hémagglutinine" purifiée révèle

la présence de bandes caractéristiques des protéines et des polysaccharides, Blaskovic, Sokol et Kociskova (362) ont d'ailleurs constaté le caractère antigénique, donc l'existence de facteurs protéiniques, des sous-unités constituant l'"hémagglutinine". Puisque la propriété hémagglutinante résiste à un enzyme protéolytique tel que la trypsine, on est en droit d'admettre qu'elle est liée à la fraction polysaccharidique.

De fait, nous avons montré qu'il est possible par l'usage de la trypsine, de supprimer l'activité neuraminidasique dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I tout en conservant la capacité de provoquer l'hémagglutination. Cependant, le spectre infrarouge ne permet pas de déceler une différence avant et après traitement par la trypsine suivi de dialyse. Il est évidemment concevable que cet enzyme n'altère que d'une manière très partielle la sous-unité d' "hémagglutinine". Quoiqu'il en soit, la neuraminidase et le support de l'hémagglutination sont intimement liés l'un à l'autre dans les sous-unités de structure de l'enveloppe externe du virion. Il est possible même qu'ils constituent une seule et même molécule mucoprotéinique. A cette association structurale, correspond semble-t-il une association fonctionnelle. En effet, l' "hémagglutinine" constituée par ces granules à double activité est capable de se libérer des hématies au cours d'une incubation à une température suffisamment élevée, les hématies étant devenues inagglutinables. Malgré ce caractère enzymatique, il est difficile d'admettre que l'affinité de l' "hémagglutinine" pour les hématies est représentée par l'affinité de la neuraminidase pour son substrat. Le "turn-over" ou nombre de rotation étant considérablement trop long, il semble donc que ce soit la présence du site hémagglutinant indépendant de l'affinité de la neuraminidase pour son substrat qui ralentisse la cinétique d'élution du virus ou de son hémagglutinine adsorbée sur les hématies.

LE SUPPORT DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE.

Au cours du développement de Myxovirus parainfluenzae I sur l'embryon de poulet, l'activité neuraminidasique apparaît en même temps que la

propriété hémagglutinante, c'est-à-dire entre la 12^{ème} et la 24^{ème} heure d'incubation.

L'activité neuraminidasique disparaît rapidement quand on soumet la particule virale à un traitement par le formaldéhyde, la trypsine ou après un certain temps d'exposition au rayonnement ultraviolet. Le broyage ou la congélation ne provoquent jamais une augmentation du titre de l'activité enzymatique, comme c'est le cas pour l'activité hémagglutinante.

On peut donc admettre l'existence d'au moins deux catégories de sites à la surface de la particule virale. Cette conclusion est corroborée par l'absence de parallélisme entre les propriétés hémagglutinante et neuraminidasique pour des préparations différentes de virus. De même, comme nous l'avons montré dans la discussion du chapitre V, première partie (page 106), l'étude comparative des caractères cinétiques de l'activité neuraminidasique de deux souches, Myxovirus influenzae B et Myxovirus parainfluenzae I, sur deux types de substrats (l'acide 3' lactose-lactaminique et le mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf) nous a également amené à reconnaître, dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, l'existence de deux "hémagglutinines" distinctes qui correspondraient en fait à deux catégories de sites d'hémagglutination distincts sur le virion. Le site responsable de l'hémagglutination réversible pourrait être identifié à l'ensemble de la neuraminidase et du site responsable de l'hémagglutination, constituant les sous-unités granulaires de 30 m μ de diamètre tandis que l'autre, responsable de l'hémagglutination insensible à la température en est distinct. L'existence, à la surface des Myxovirus de deux catégories de sites capables de fixer les hématies permet de comprendre pourquoi il existe d'une part des inhibiteurs qui ne sont pas des substrats de la neuraminidase et, d'autre part, des substrats qui ne sont pas des inhibiteurs. Un substrat tel que le mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf apparaît doué d'affinité pour les deux catégories

de sites et se comporte à la fois comme un inhibiteur non spécifique et un substrat. L'acide 3'lactose-lactaminique doué d'affinité uniquement pour les sites de l'hémagglutination réversible, c'est-à-dire pour la neuraminidase virale, est un substrat, mais non pas un inhibiteur. Les différences observées entre les divers Myxovirus permettant de les classer suivant un "gradient de récepteur" (Burnet, Mac Crea et Stone (418)) peuvent s'expliquer par une répartition différente de deux catégories de sites à la surface des particules virales. Ces deux sites paraissent intimement associés l'un à l'autre dans l'enveloppe externe du virion pour constituer ces sous unités de 30 m μ de diamètre, obtenues après désintégration par l'éther.

De même que les autres constituants de l'enveloppe externe du virion, la neuraminidase aurait une origine uniquement cellulaire. Ada et Lind (364) ont montré que la neuraminidase n'est décelable dans les cellules normales de la membrane chorioallantoïque que du I6^{ème} au I9^{ème} jour, c'est à-dire peu de temps avant l'éclosion (Ada (365)), ce que nous avons pu confirmer par la recherche négative de l'activité enzymatique dans le liquide allantoïque normal prélevé au II^{ème} ou au I2^{ème} jour d'incubation. Il faudrait donc admettre que la biosynthèse du virus provoque une accélération considérable du processus de synthèse de l'enzyme.

La purification de la neuraminidase des souches Asia, PR₈, B Lee, a été obtenue par Wilson et Rafelson (I97) en traitant les suspensions virales à l'aide de la chymotrypsine pendant quinze heures à la température de + 37°C puis en concentrant le liquide de dialyse. L'étude chimique du produit final a montré que cette substance était une protéine.

La neuraminidase du virus de la maladie de Newcastle a été purifiée par Drzeniek et Rott (367) grâce à une méthode de chromatographie sur colonne de phosphate de calcium, mais Seto (368) a également souligné que dans le cas de ce virus, cet enzyme était très fortement associé à l'activité hémagglutinante lors de l'isolement des sous-unités après traitement des particules entières à l'aide de l'éther déperoxydé.

En revanche, dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, nous avons montré que la neuraminidase est très rapidement détruite par la trypsine, ce qui confirme la nature protéinique de la molécule support de cette propriété, mais empêche son isolement à l'aide de cette méthode.

Quant au rôle de la neuraminidase, il est très controversé. Pour Johnson, Pekas et Winzler (369) les sites récepteurs sont nécessaires au moment de la fixation des virus grippaux puisqu'on peut protéger les cellules chorioallantoïques de l'infection par Myxovirus influenzae B Lee grâce à différentes neuraminidases purifiées. Cette action enzymatique marquerait donc une étape dans la pénétration cellulaire bien que l'action protectrice de la neuraminidase soit très faible dans le cas de l'infection par Myxovirus influenzae A (PR₈). En revanche, pour Knight (370), l'infection est encore possible si on détruit les récepteurs par le periodate. De même on isole de l'interféron dans les cellules chorioallantoïques mises en contact avec du virus inactivé par la chaleur ce qui prouve bien la pénétration de ce dernier.

La neuraminidase agirait plutôt dans la dernière phase du cycle viral c'est-à-dire en libérant la particule au cours du phénomène de protrusion. Padgett et Walker (371) ont vérifié cette hypothèse formulée par Hoyle (372) en 1950, en montrant que la période de latence pendant laquelle se produit la pénétration virale était la même, quelle que soit l'activité enzymatique d'un variant d'une souche grippale de type B.

Pour Bogoch, Gilfillan et Evans (373), la neuraminidase jouerait un rôle dans l'infection virale en neutralisant une substance appelée sialoresponsine qui apparaît dans les premières minutes qui suivent la pénétration de la particule virale. Le taux d'infection serait ainsi fonction de l'activité enzymatique.

Enfin, les observations faites au cours de l'étude de l'effet du virus sur la viscosité des solutions de mucopolysaccharide nous ont permis

de mettre en évidence l'importance des lipides et de montrer combien l'interprétation des propriétés biologiques est délicate et dépend de la purification.

LE SUPPORT DE L'ACTIVITÉ HÉMOLYTIQUE

L'activité hémolytique est une propriété virale que présentent exclusivement les Myxovirus de grande taille. Elle peut être spécifiquement inhibée par les immunsérums antiviraux.

Comme nous l'avons montré, elle est détruite par l'action des agents chimiques tels que l'éther déperoxydé, le méthanol, l'isopropanol, le formaldéhyde, les sels biliaires ou par des agents physiques tel que le rayonnement ultraviolet.

Sa sensibilité à l'éther évoque l'idée qu'elle pourrait être de nature lipidique, par exemple lysophosphatidique, mais l'étude comparative du pouvoir hémolytique de la lysolécithine et du pouvoir hémolytique du virus a fait apparaître des différences marquées qui ne sont pas en faveur de cette hypothèse. En effet, les courbes représentatives du phénomène sont d'aspect sigmoïdal dans le cas de l'hémolyse provoquée par la lysolécithine alors qu'elles sont de type exponentiel dans le cas de l'hémolyse virale. De plus, pour que celle-ci se produise de manière optimale, il est nécessaire d'élever la température à $+ 37^{\circ}\text{C}$ alors que l'optimum d'action de la lysolécithine est de $+ 4^{\circ}\text{C}$.

Quand on désintègre les virions, par exemple à l'aide de l'éther, on perd l'activité hémolytique. L'hypothèse a été soulevée que la substance hémolytique supposée de nature lipidique pourrait perdre son activité en formant des micelles complexes avec d'autres lipides ou même avec des substances non lipidiques. Il a donc paru utile de chercher à caractériser chimiquement les lysophosphatides dans les fractions lipidiques du virus.

Cette recherche, poursuivie à l'aide de la chromatographie en couche mince et par microspectrographie infrarouge s'est révélée négative. Les seules méthodes qui permettent d'obtenir des fragments hémolytiques à partir des virions sont le broyage mécanique ou l'alternance de congélations et de décongélations. Malheureusement, les tentatives de séparation de l'activité hémolytique d'une part et du pouvoir d'héماغglutiner d'autre part, à l'aide de la technique de l'ultracentrifugation en gradient de densité n'ont donné aucun résultat. Il y a constamment association des deux propriétés sur les mêmes particules.

L'activité hémolytique ne peut se manifester que si le virion est préalablement adsorbé à la surface de l'hématie, ainsi, si on traite des hématies à l'aide de la neuraminidase cholérique ou si on bloque les récepteurs à l'aide des Myxovirus non hémolytiques, on obtient une diminution du titre hémolytique, ce qui a permis à Neurath (374) puis à Neurath et Sokol (375) de classer les Myxovirus suivant " la susceptibilité de l'hématie " à leur égard.

La variation de perméabilité cellulaire qui permet la libération de l'hémoglobine est précédée d'une sortie des ions K + selon Klemperer (266). Cette perturbation de l'équilibre produit un gonflement de la cellule qui aboutit à la rupture de celle-ci.

L'hémolyse obtenue par l'action des Myxovirus n'est jamais totale ; une certaine quantité d'hémoglobine demeurant à l'intérieur des stromas.

L'étude cinétique nous a permis de montrer que la limite atteinte par l'hémolyse était proportionnelle à la concentration virale suivant l'équation générale,

$$100 \frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp [p_0 (1 - \eta \lim_{t \rightarrow \infty}) t] - 1}{\exp [p_0 (1 - \eta \lim_{t \rightarrow \infty}) t] - \eta \lim_{t \rightarrow \infty}} \quad (7)$$

où N désigne le nombre d'hématies non hémolysées au temps t, N_0 le nombre initial d'hématies, po la pente à l'origine et γ_{lim} , la limite atteinte par l'hémolyse.

Les courbes représentatives sont de type exponentiel. Elles sont très voisines de celles que l'on observe dans le cas de l'hémolyse immunologique en présence de complément et d'une quantité limitée d'anticorps. Il s'agit d'une cinétique de type pseudo-enzymatique. Mayer, Croft et Gray (376) admettent dans ce cas que le système antigène-anticorps-complément active un enzyme latent qui, secondairement, libère des produits de dégradation qui sont les substances hémolytiques.

Dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, la comparaison entre l'équation établie en fonction de la concentration en hématies :

$$\frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp[\beta_1 C (1 - \beta_2 S/C)t] - 1}{\exp[\beta_1 C (1 - \beta_2 S/C)t] - \beta_2 S/C}$$

où β_1 et β_2 sont des constantes, la première de l'ordre de 0,1, la seconde de l'ordre de 1, dépendant de la température, de la nature des hématies et des traitements subis par les hématies et le virus ; S, la concentration initiale en hématies ($S = I$ pour une suspension au 1/100) ; C, la concentration initiale en virus ($C = I$ pour une suspension virale titrant 160 Unités Hirst).

et la relation théorique née d'une hypothèse simple

$$\eta = \frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp[\beta_1 V_0 (1 - \gamma_1 N_0/V_0)t] - 1}{\exp[\beta_1 V_0 (1 - \gamma_1 N_0/V_0)t] - \gamma_1 N_0/V_0} \times 100 \quad (15)$$

où ΣI dépend des mêmes paramètres que β_I ; V_0 , représente le nombre initial d'agents hémolysants, et V le nombre d'agents hémolysants au temps t .

permet de penser que les agents actifs sont consommés dans la réaction, c'est-à-dire que l'hémolysine ayant servi à provoquer l'hémolyse d'une première hématie devient incapable d'en détruire une autre. Il semble donc que le virus fixé sur une hématie et provoquant l'hémolyse est incapable de s'en détacher même quand la lyse est achevée.

En reprenant le raisonnement de Mayer, Croft et Gray (376) et en l'appliquant au cas des Myxovirus, on pouvait penser que la substance hémolytique était formée par les produits de dégradation obtenus par l'action de la neuraminidase sur le substrat mucopolysaccharidique. Ces produits auraient eu de l'affinité pour les lipides et auraient donné par exemple des complexes lipoprotéidiques hémolytiques. Toutes les tentatives pour essayer de vérifier cette hypothèse ont échoué.

Pour approfondir la nature du phénomène hémolytique, il était nécessaire de rechercher la relation possible entre lui et la pénétration du virus dans les cellules où il peut se développer.

Okada, Surucki et Hosaka (377) puis Okada (378), montrèrent que les cellules tumorales d'Ehrlich en culture fusionnent quand la souche de Myxovirus parainfluenzae I était suffisamment hémolytique et que la température était maintenue à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant la durée de l'expérience. Ce phénomène fut observé au microscope électronique par Okada (379) qui confirma la formation de cellules géantes dues à une cytolysse plutôt qu'à une multiplication cellulaire intracytoplasmique et par Okada et Tadokoro (380, 381, 382) qui établirent un indice de fusion pour des conditions optimales de pH et de température.

La distribution de deux types de virus dans 24 souches de Myxovirus parainfluenzae I, l'un très hémolytique, représenté par la souche japonaise

(Sendaï, U.F.A., M.N., P.U.G.) l'autre, peu hémolytique représenté par la souche Vladivostok (960, LM_T, EMV) permit à Ho et Gorbunova (384, 385) d'établir une relation entre l'effet cytopathogène et le degré d'hémolyse, les syncythiums étant d'autant plus importants que la souche était plus hémolytique.

Ce phénomène avait déjà été mis en évidence avec le virus ourlien cultivé sur des cellules épithéliales par Henlé, Deinhardt et Girardi (386), puis par Russell et Morgan (387) sur les tissus conjonctifs de rein et de foie. Ces auteurs proposèrent le nom de cytolysine pour désigner la substance qui était responsable de l'apparition des syncythiums, tandis que Bukrinskaya et Zhdanov (388), dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, préférèrent les termes de "Cell wall destroying enzyme" (CWDE) ou de "Second entry enzyme".

Pour Gorbunova, Ho et Yershow (389, 390), la caractéristique de cet effet pathogène provient du fait qu'il ne peut se transmettre par passages successifs en culture de tissus et que l'apparition de syncythiums secondaires n'est pas due à une action hémolytique directe, confirmant ainsi les essais de transmission infructueux de Gresser (391).

Il convient cependant de noter que pour Demont, Berkaloïf et Colobert (315) et Colobert et Berkaloïf (397), la formation de syncythiums et l'effet cytopathogène consécutif obtenu sur les cellules KB quand l'inoculum de Myxovirus parainfluenzae I est suffisamment élevé, serait la conséquence d'un épuisement de la cellule du fait d'un mécanisme de répression de la biosynthèse du virus, c'est-à-dire d'un phénomène d'interférence complètement indépendant de la présence d'une hémolysine éventuelle dans le virus.

Dans l'oeuf embryonné, l'activité hémolytique est fonction de l'inoculum. Sokol, Neurath et Vilcek (392) ont montré que le titre infectieux baissait en fonction du nombre de passages et que cette chute s'ac-

compagnait d'une baisse de l'activité hémolytique, ce qui confirme nos résultats (Colobert et Fontanges (393)), où le titre hémolytique diminue après passage du virus à des dilutions limites inférieures, conclusions retrouvées par Tadokoro (394, 395). L'existence de particules non hémolytiques dans le liquide allantoïque serait pour Neurath (396) le reflet de différences quantitatives dans la multiplication virale en fonction de certaines conditions. En réalité, il est très difficile d'affirmer qu'une particule virale, mise en évidence à l'aide de son activité hémagglutinante, est dépourvue de toute activité hémolytique. Les différences de sensibilité que présentent les méthodes de titrage, l'impossibilité actuelle de définir une unité hémolytique sont autant de causes d'erreur.

Devant ces résultats, il semble logique d'attribuer une nature protéinique ou plutôt lipoprotéinique à la molécule support de la propriété hémolytique, cette hypothèse se trouvant appuyée par l'action des enzymes protéolytiques et des solvants des lipides.

Il est d'ailleurs possible que la substance responsable de l'hémolyse ne soit pas hémolytique par elle-même. On peut concevoir que l'hémolyse est le résultat de l'adsorption irréversible du virus à la surface de l'hématie, adsorption suffisamment intime pour provoquer la modification de perméabilité cellulaire constatée par Puck et Lee (264). On peut observer, en faveur de cette hypothèse qu'il existe une corrélation étroite entre, d'une part, la place des Myxovirus dans le gradient de récepteur établi dès 1946 par Burnet, Mc Crea et Stone (418), d'autre part, la tendance à donner des fixations irréversibles sur les hématies et enfin l'activité hémolytique. Il est vraisemblable que ces trois propriétés traduisent le même phénomène. En effet, Burnet (418) établit son gradient de récepteur d'après la propriété par laquelle des hématies rendues incapables de fixer une souche donnée après un contact suffisant avec celle-ci sont encore capables de fixer une ou plusieurs autres souches virales. La neuraminidase des différents Myxovirus ayant, semble-t-il, la même spécificité d'action, il faut admettre qu'il existe à côté des récepteurs de l'enzyme, un autre type de récepteurs,

pour lequel l'adsorption serait en fait une adsorption irréversible.

La propriété d'hémolyser dépendrait du nombre et de la qualité de ses sites permettant la fixation irréversible du virus.

Les souches des différents Myxovirus se classent dans le même ordre de succession, que l'on considère le critère de Burnet (418) ou la capacité de provoquer l'hémolyse.

Il reste évidemment à discuter de la nature du site du virus et du site de l'hématie capables de se lier l'un à l'autre de manière assez intime pour provoquer l'hémolyse.

On peut admettre, en s'appuyant notamment sur les faits des solvants des lipides, que le site viral responsable de l'adsorption irréversible serait un lipide et plus vraisemblablement un lipide ionisé puisque selon Nicoli, Betail et Colobert (91) Myxovirus parainfluenzae I est capable de s'adsorber sur des supports très divers à condition qu'ils présentent une charge.

Il se pourrait donc que les phospholipides, lécithine et sphingomyéline de l'enveloppe externe du virus soient responsables de cette adsorption puisque ces deux constituants y sont présents, comme nous l'avons montré.

L'effet inhibiteur du cholestérol et de la lécithine peut s'expliquer par une compétition entre ces sites et ceux de l'hématie.

Quant à l'effet de la température sur la cinétique d'hémolyse qui atteint un maximum très marqué à + 37°C, il pourrait être attribué à des modifications des constituants de surface de l'hématie elle-même.

LE SUPPORT DU POUVOIR INFECTIEUX.

Le fait que l'on a pu isoler des acides ribonucléiques capables de provoquer l'infection des cellules sensibles à partir de nombreux virus, permet de soulever l'hypothèse que le pouvoir infectieux des Myxovirus est également supporté uniquement par leur acide ribonucléique.

Dès 1959, Portocala et coll. (399 à 405) d'une part, Maassab (406, 407) d'autre part, estimèrent avoir isolé à l'aide de la technique d'extraction de l'acide ribonucléique par la méthode du phénol à froid selon Gierer et Schramm (398), une substance infectieuse à partir de Myxovirus influenzae A_I et du virus de la maladie de Newcastle, substance répondant aux propriétés chimiques de l'acide ribonucléique et détruite par la ribonucléase. Son inoculation à des oeufs embryonnés, immédiatement après la préparation provoquerait une infection aboutissant à la libération de particules complètes, antigéniquement identiques à la souche initiale.

En revanche, les travaux parallèles menés par Sokol et Szurman (408), Ada, Lind, Larkin et Burnet (409), Szurman (410) et enfin Sokol et Schramek (411) sur les souches de Myxovirus influenzae B, A₂ et du virus de la maladie de Newcastle ne permirent pas à ces auteurs d'isoler un principe infectieux au cours des essais d'inoculation à l'embryon de poulet, à la souris et à des cellules en culture.

Des essais personnels d'extraction de l'acide ribonucléique à partir d'un liquide allantoïque infecté par Myxovirus parainfluenzae I et dont le titre infectieux était de $10^9 \text{DI}_{50}/\text{ml}$, ne furent suivis d'aucune transmission de l'infection. La technique employée consistait à traiter la suspension virale à l'aide d'une solution de dodécylsulfate de sodium pour dissocier les particules puis d'extraire l'acide ribonucléique par du phénol redistillé, à froid, en présence de bentonite et, après avoir éliminé l'acide désoxyribonucléique à l'aide de desoxyribonucléase (0,1 g/ml) pendant quinze minutes

à la température de 0°C.

Devant ces résultats discordants, on peut se demander si, dans le cas où la transmission est positive, quelques particules n'ont pas résisté au traitement par le dodécylsulfate de sodium ou au phénol plutôt que d'incriminer celui-ci quand il n'est pas d'origine russe comme l'ont dit si bien Portocala et Andreescu (403).

Wecker (412) d'une part, Schäfer (413) d'autre part ont conseillé l'emploi du phénol à chaud (40°C à 60°C) dans le cas où les particules virales contiennent une forte proportion de lipides. En appliquant cette technique, ces auteurs isolent de l'acide ribonucléique infectieux à partir des virus de l'encéphalite équine de l'Ouest et de la peste aviaire.

Cette méthode ne donnant aucun résultat positif entre nos mains dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, on pouvait penser qu'il était nécessaire que l'acide ribonucléique ait sa structure secondaire stabilisée à l'aide de la protéine périphérique c'est-à-dire l'antigène S. Celui-ci peut en outre protéger l'acide ribonucléique des ribonucléases. Il est facile d'obtenir ces éléments - les nucléocapsides - par exemple après désintégration des virions par l'éther déperoxydé ou même plus simplement, quoique de façon plus partielle, par congélations-décongélations répétées. A la suite d'autres auteurs qui avaient tenté ces expériences, nous n'avons pu mettre en évidence le caractère infectieux de ces éléments.

Pour expliquer cet échec, on pourrait admettre tout d'abord que l'acide ribonucléique pur ou associé à l'antigène S dans les nucléocapsides ne pénètre pas dans les cellules. Normalement l'infection de celles-ci se fait par pinocytose. C'est ainsi qu'en 1948 Fazekas de St-Groth (414) désigna sous le nom de "viropexie" le phénomène par lequel un virus était pour ainsi dire englouti dans son entier à l'intérieur de la cellule hôte. Son hypothèse, qui était fondée sur le fait que la pénétration virale ne dépendait ni de la viabilité de la particule, ni de son activité enzyma-

tique, mais seulement de l'intégrité fonctionnelle de la cellule, fut vérifiée au microscope électronique par Dales et Choppin (4I5) avec Myxovirus influenzae A₂ et par Berkaloff et Colobert (4I6) avec Myxovirus parainfluenzae I.

Il se peut que dans le cas de l'acide ribonucléique pur ou de la nucléocapside, les cellules ordinairement sensibles au virion complet, possédant une enveloppe périphérique où se trouvent localisées les propriétés hémagglutinantes, ne soient pas compétentes. On pourrait envisager l'inoculation directe dans la cellule par micromanipulation. Thierry et Berkaloff (4I7) ont montré que le pH influence de manière marquée la morphologie de la nucléocapside. A pH voisin de la neutralité, elle est rigide et se fragmente tandis que les éléments de structure disposés en hélice tout le long de la nucléocapside sont plus déliés et inclinés par rapport à l'axe. De plus, la nucléocapside à pH acide paraît beaucoup moins fragile, plus souple et n'a plus tendance à se fragmenter en segments courts. Il est possible que l'échec de la transmission de l'infection soit lié à quelque altération morphologique de la nucléocapside sous l'influence des conditions physico-chimiques.

Enfin, il se peut qu'au cours de la préparation de l'acide ribonucléique une grande partie de celui-ci soit dénaturée. On peut concevoir que la grande proportion des éléments dénaturés provoque un phénomène d'interférence qui inhibe l'induction provoquée par les particules infectieuses se trouvant dans la préparation. En revanche, dans le cas de la particule complète, l'élément infectieux se trouve protégé pendant suffisamment longtemps au sein de la cellule lors de la dégradation du virion, pour que l'effet inhibiteur ne puisse pas se produire.

*

*

*

Il paraît donc démontré que la propriété neuraminidasique peut être supportée par une espèce chimique définie indépendamment des autres propriétés.

Lorsqu'on désintègre les virions aussi bien par des moyens physiques que par des solvants des lipides la substance responsable de l'hémagglutination se trouve constamment associée à la neuraminidase avec laquelle elle constitue un élément particulaire de 30 m μ de diamètre présentant les caractéristiques spectrales des protéines et des polysides. On a toute raison d'admettre que ces éléments particuliers font partie intégrante de l'enveloppe externe du virion. Il semble cependant que tout au moins dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I il existe deux types d'hémagglutinine, l'un est une hémagglutinine thermosensible et réversible, l'autre provoquant une hémagglutination thermostable et irréversible. La neuraminidase pourrait bien être responsable du premier type d'adsorption, le second type n'étant pas en relation avec une propriété enzymatique.

Il n'est pas certain que l'hémolyse soit provoquée par une substance hémolytique de manière intrinsèque, comme c'est le cas par exemple pour la lysolécithine. On a des raisons de penser que les substances responsables de l'hémagglutination irréversible sont aussi responsables de l'hémolyse. C'est l'adsorption intime du virus sur les sites particuliers de la surface de l'hématie qui provoqueraient des modifications de la perméabilité suivies de la rupture osmotique. On a soulevé l'hypothèse que les phospholipides de l'enveloppe externe de l'hématie pourraient être des substances responsables d'une part, du phénomène direct qu'est l'hémagglutination et d'autre part, du phénomène indirect et secondaire qu'est l'hémolyse.

L'ensemble de ces trois propriétés d'hémagglutiner, d'hémolyser et de libérer l'acide sialique est donc supporté par les éléments de l'enveloppe externe du virion qui n'est autre qu'un fragment de la membrane

cytoplasmique de la cellule hôte.

Il n'a pas été possible de démontrer que le pouvoir infectieux est supporté par les structures internes du virion, c'est-à-dire les nucléocapsides ou par le constituant ribonucléique de celle-ci. Il est possible que cet échec soit en relation avec la fragilité de ces deux éléments et de leur forte dépendance des conditions physico-chimiques. Il est possible encore que l'échec soit attribué à la modification de la compétence de la cellule sensible, celle-ci n'ayant plus aucune affinité pour l'acide ribonucléique ou pour la nucléocapside.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons tenté d'isoler et de caractériser les constituants chimiques supportant les différentes propriétés biologiques de Myxovirus prenant comme type, d'une part Myxovirus influenzae B, souche Lee qui appartient au groupe des Myxovirus non hémolytiques et d'autre part, Myxovirus parainfluenzae I (virus Sendai) qui appartient au groupe des Myxovirus hémolytiques.

Nous avons été amenés à mettre au point de nouvelles méthodes plus précises pour le titrage du pouvoir hémagglutinant, du pouvoir neuraminidase et du pouvoir hémolytique. La méthode de titrage du pouvoir hémagglutinant proposée, consiste à suivre la vitesse de sédimentation des agglutinats d'hématies provoqués par le virus ou par ses constituants.

La méthode de titrage proposée pour l'étude de l'activité neuraminidase consiste à suivre par une méthode colorimétrique la libération de l'acide neuraminidase à partir de l'acide 3'lactose-lactaminique utilisé comme substrat.

Le titrage de l'activité hémolytique est réalisé en déterminant par photométrie le pourcentage d'hémoglobine libérée à partir d'hématies humaines quand l'hémolyse a atteint sa valeur limite.

L'usage de ces techniques nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

1° - dans le cas de Myxovirus parainfluenzae I, le virus formé sur embryon de poulet est identique à lui-même pendant toute la durée du développement de l'infection. Myxovirus parainfluenzae I ne présente donc pas de différence à ce point de vue avec Myxovirus influenzae B déjà étudié par d'autres auteurs.

2° - on savait déjà que dans le cas de Myxovirus influenzae B, la neuraminidase est supportée par une espèce chimique définie (une protéine)

indépendamment de ses autres propriétés. Elle peut être obtenue à l'état pur au moyen d'un traitement ménagé d'enzymes protéolytiques. Nous avons constaté que cette méthode de préparation ne peut s'appliquer à Myxovirus parainfluenzae I dont la neuraminidase ne résiste pas à l'action de la trypsine. Cependant, l'étude cinétique de la disparition du pouvoir neuraminidasique alors que persiste sans modification le pouvoir hémagglutinant, permet de conclure qu'ici encore, le support de l'activité neuraminidasique est chimiquement distinct du support du pouvoir hémagglutinant.

Lorsqu'on désintègre les virions, que ce soit par des moyens physiques ou à l'aide des solvants des lipides, la substance responsable de l'hémagglutination se trouve constamment associée à la neuraminidase avec laquelle elle constitue un élément particulaire de 30 m μ de diamètre présentant les caractéristiques spectrales infrarouges des protéines et des polysides. On a toute raison d'admettre que ces éléments particuliers font partie intégrante de l'enveloppe externe du virion.

3° - Le virus Sendaï présente deux types d'hémagglutination, l'un est une hémagglutination réversible, thermosensible mais largement indépendante de la concentration en sels du milieu, l'autre est une hémagglutination insensible à l'élévation de la température, mais l'élution peut être obtenue en modifiant la concentration en ions du milieu. Myxovirus influenzae B ne présente que le premier type d'agglutination supporté par les sous-unités de structure de 30 m μ de diamètre où se trouvent associés un site capable de s'adsorber sur les hématies et un site enzymatique (neuraminidase). Myxovirus parainfluenzae I présenterait donc dans son enveloppe externe d'une part, ces sous-unités de structure, responsables de l'agglutination réversible sous l'effet de la température et d'autre part, des sites complètement distincts et indépendants de la neuraminidase.

4° - L'activité hémolytique manifestée par Myxovirus parainfluenzae I suit une loi exponentielle qui présente les caractéristiques suivantes :

- la pente à l'origine est indépendante de la concentration en hématies,
- elle est proportionnelle à la concentration en virus,
- l'hémolyse atteint une limite proportionnelle à la concentration en virus.

En désignant par N le nombre d'hématies non hémolysées au temps t, par N_0 le nombre initial d'hématies, par C la concentration en virus et par S la concentration initiale en hématies, où β_1 et β_2 sont des constantes, l'équation représentant la cinétique de l'hémolyse est la suivante:

$$\frac{N_0 - N}{N_0} = \frac{\exp (\beta_1 C (I - \beta_2 S/C) t) - I}{\exp (\beta_1 C (I - \beta_2 S/C) t) - \beta_2 S/C}$$

5° - En posant comme hypothèse que le nombre d'hématies hémolysées est proportionnel au nombre de particules virales hémolysantes et au nombre d'hématies, on calcule que la loi d'hémolyse est analogue à celle observée expérimentalement. On en conclut que l'agent hémolytique (virus ou hémolysine) après s'être fixé sur une hématie pour la détruire est incapable de se libérer pour en détruire une autre.

Bien que la lysolécithine soit également incapable de se libérer des hématies qu'elle a détruite, la cinétique de l'hémolyse provoquée par cette substance est tout à fait différente de celle provoquée par Myxovirus parainfluenzae I, notamment, elle a l'allure d'une sigmoïde. On en déduit qu'il est peu vraisemblable que l'agent hémolytique viral soit un lysophosphatide.

De fait, il a été impossible de caractériser des lysophosphatides parmi les lipides constitutifs de Myxovirus parainfluenzae I.

6° - Le pouvoir hémolytique du virus augmente considérablement

quand les virions sont soumis à un traumatisme physique aboutissant à la désintégration de l'enveloppe extérieure. En revanche, le pouvoir hémolytique disparaît dès que l'on ajoute à une suspension de virions une trace d'éther éthylique, de méthanol, d'isopropanol, de sels bili-aires. Ceci est en faveur de l'idée que le support de l'activité hémolytique est un lipide.

7° - Le formol, la trypsine font disparaître également l'activité hémolytique. Lorsque le méthanol est utilisé à basse température, l'activité hémolytique est conservée. Ces facteurs étant connus comme capables d'altérer les protéines, on pouvait imaginer que ces substances jouent un rôle dans l'activité hémolytique. L'hypothèse de la nature lipoprotéinique du support de l'activité hémolytique peut être soulevée.

On peut envisager en réalité que l'hémolyse n'est pas due à l'entrée en jeu d'une substance spécifique contenue dans le virus, mais résulterait de la modification de perméabilité de la membrane de l'hématie, du fait de l'héماغglutination non réversible. Le support de l'activité hémolytique se confondrait avec les constituants de l'enveloppe externe du virion responsables de l'héماغglutination insensible à l'action de la température.

On peut trouver un argument en faveur de cette conception dans le fait que l' "hémolysine" extraite des virions par broyage mécanique ou par alternance de congélation décongélation apparaît de nature particulière au cours de l'ultracentrifugation en gradient de densité et paraît constamment associée à l'activité héماغglutinante.

8° - Le pouvoir infectieux n'a pas pu être rapporté à l'acide ribonucléique du virus ni à l'unité de structure constituée par la nucléocapside (association organisée de l'acide ribonucléique viral et de l'antigène soluble).

R E F E R E N C E S

B I B L I O G R A P H I Q U E S

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(par ordre d'arrivée dans le texte)

INTRODUCTION

- I - LWOFF (A.), ANDERSON (T.F.) et JACOB (F.) - Remarques sur les caractéristiques de la particule virale infectieuse. Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, (281-289).
- 2 - HORNE (R.W.), WATERSON (A.P.), WILDY (P.) and FARNHAM (A.E.) - The structure and composition of the myxoviruses. I- Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. Virology, 1960, II, (79-98).
- 3 - HORNE (R.W.) and WATERSON (A.P.) - A helical structure in mumps, ND and Sendai viruses. J. Mol. Biol., 1960, 2, (75-77).
- 4 - HORNE (R.W.) and WILDY (P.) - Recent studies on the fine structure of viruses by electron microscopy, using negative staining techniques. Brit. med. bull., 1962, 18, (194-204).
- 5 - WATERSON (A.P.) and HURRELL (J.M.V.) - The fine structure of the Parainfluenza viruses. Archiv. für die gesamte Virusforsch., 1962, 12, (138-142).
- 6 - BRENNER (S.) and HORNE (R.W.) - A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. B.B.A., 1959, 34, (103-110).
- 7 - HOWATSON (A.F.) and WHITMORE (G.F.) - The development and structure of vesicular stomatitis virus. Virology, 1962, 16, (466-478).
- 8 - ZHDANOV (V.M.), MEKLER (L.B.), KLIMENKO (S.M.) and NAUMOVA (V.C.) - Chemical nature of substances forming the surface of the influenza virus. Nature, 1963, 198, (1326-1327).
- 9 - HOYLE (L.), HORNE (R.W.) and WATERSON (A.P.) - The structure and composition of the myxoviruses. II - Components released from the influenza virus particle by ether. Virology, 1961, 13, (448-459).

- I0 - CHOPPIN (P.W.), MURPHY (J.S.) and STOECKENIUS (W.) - The surface structure of influenza virus filaments.
Virology, 1961, 13, (548-550).
- II - HOSAKA (Y.), HOSOKAWA (Y.) and FUKAI (K.) - Structure of HVJ - I - Two kinds of subunits of H V J.
Biken's J., 1960, 3, (27-40).
- I2 - ROTT (R.), WATERSON (A.P.) and REDA (I.M.) - Characterization of 'soluble' Antigens derived from cells infected with Sendai and N.D.V.
Virology, 1963, 21, (663-665).
- I3 - ROTT (R.), FRANK (H.) und SCHAFER (W.) - Isolierung und eigenschaften der hämagglutinierenden Komponente des Virus der ND.
Z. Naturforsch., 1961, 16, (625-626).
- I4 - HOSAKA (Y.), NISHI (Y.) and FUKAI (K.) - The structure of HVJ.
II - The fine structure of the subunits.
Biken's J., 1962, 4, (243-54).
- I5 - HAMAR (M.) and ROSENBERG (M.) - Morphology of the type D influenza virus.
Acta Virologica, 1958, 2, (65-68).
- I6 - STEFANOV (S.B.) - Etude sur les micrographies électroniques du polymorphisme des myxovirus. I. Bâtonnets, corps filiformes et chaînes polymorphes dans des cultures de virus Sendai. (en russe).
Zh. obsch. Biol.S.S.S.R., 1960, 21, (377-380).

P R E M I E R E P A R T I E

CHAPITRE I

- I7 - FONTANGES (R.), GARRIGUE (J.) et COLOBERT (L.) - Développement de l'infection par Myxovirus parainfluenzae I sur l'embryon de poulet.
Ann. Inst. Pasteur, 1964, 106, (727-737).
- I8 - KUROYA (M.), ISHIDA (N.) and SHIRATORI (T.) - Newborn virus pneumonitis - The isolation of new virus possessing hemagglutinin activity.
Yokohama Med. Bull., 1953, 4, (217-233).
- I9 - SANO (T.), NIITSU (I.), NAKAGAWA (I.) and ANDO (T.) - Newborn virus pneumonitis (type Sendai) - Clinical observation of a new virus pneumonitis of the newborn.
Yokohama Med. Bull., 1953, 4, 199-216).

- 20 - FUKUMI (H.), NISHIKAWA (F.) and KITAYAMA (T.) - A pneumotropic virus from mice causing hemagglutination.
Jap. J. Med. Sci. Biol., 1954, 7, (345-347).
- 21 - NISHIKAWA (F.) and FUKUMI (H.) - Shape and size of hemagglutinating virus of mice.
Jap. J. Med. Sci. Biol., 1954, 7, (513-522).
- 22 - SASAHARA (J.), HAYASHI (S.), KUMAGAI (T.), YAMAMOTO (Y.), HIRASAWA (N.), MUNEKATA (K.), OXANIWA (A.) and KATO (K.) - On a swine virus disease newly discovered in Japan. Its characteristic traits of pneumonia. I- Isolation of the virus. II- Some properties of the virus.
Virus, 1954, 4, (131-139).
- 23 - GARDNER (P.S.) - Serological evidence of infection with Sendai virus in England.
Brit. Med. J., 1957, 5028, (1143-1144).
- 24 - SOMMERVILLE (R.G.) and CARSON (H.G.) - Newborn pneumonitis virus (type Sendai). Evidence of infection in South - West Scotland.
Brit. Med. J., 1957, 5028, (1145).
- 25 - WHITE (G.B.R.), GARDNER (P.S.) and SIMPSON (R.E.H.) - Infection with Sendai virus in an outbreak of respiratory illness.
Brit. Med. J., 1957, 5028, (381-383).
- 26 - VIVELL (O.), REIMOLD (G.) und YOSHIOKA (H.) - Uber das Vorkommen von Antikörpern gegen das grippevirus type D.
Arch. Kinderheilkde Dtsch., 1959, 159, (28-37).
- 27 - COCCUZA (G.), ROCCUZO (M.) - Frequenza degli anticorpi verso il virus Sendai nella popolazione normale siciliana.
G. Batteriol. Virol. Immunol. Ital., 1959, 52, (114-130).
- 28 - SIEGERT (R.), FALKE (D.), DIETRICH (F.) und FRIOLET (B.) - Influenzavirus - Infektionen des type D/Sendai in Deutschland.
Dtsch. Med. Wschr., 1959, 84, (659-663).
- 29 - FAUCONNIER (B.), THIBON (M.) et CATEIGNE (G.) - La présence de la grippe D en France.
Sem. Hop. Paris, 1959, 35, (1023-1024).
- 30 - STARK (J.E.), HEATH (R.B.) and PETO (S.) - A study of the antibodies against parainfluenza viruses in childrens' sera.
Arch. Ges. Virusforsch., Osterr., 1964, 2, (160-168).
- 31 - BENEDETTO (A.), BALDUCCI (M.) et LIPPI (M.) - Ricerche in soggetti sani degli anticorpi devianti il complemento verso il virus dell'influenza D e l'emoadsorbente tipo 2 e loro affonate con il virus parotidico.
Riv. Ist. sieroter. Ital., 1960, 35, (480-490).

- 32 - SIEGERT (R.), ENDERS (G.) und HECHER (A.) - Parainfluenza Infektionen in Westdeutschland.
Dtsch. Med. Woch., 1961, 86, (1893-1899).
- 33 - FROTHINGHAM (T.E.) and SANYAKORN (C.K.) - Parainfluenza viruses in Southern Louisiana.
Pub. Health Rep., 1961, 76, (765-770).
- 34 - ANANTHANARAYAN (R.) and JAYARAM PANIKER (C.K.) - Serological evidence of Sendai virus infections in Kerala.
Indian Practit., 1962, 15, (41-51).
- 35 - CHANG (S.S.), CHEN (C.Y.), LIU (C.M.), LEE (H.S.) and LEE (Y.J.) - Seroepidemiologic study of influenza type A₁, A₂, B et p.Infl. type I (HVJ) infections in medical students.
J. Form. Med. Associat., 1964, 61, (460-467).
- 36 - HEATH (R.B.), TYRRELL (D.A.J.) and PETO (S.) - Serological studies with Sendai virus.
Brit. J. Exptl. Pathol., 1962, 43, (441-443).
- 37 - CHANOCK (R.M.), PARROTT (R.H.), BELL (J.A.), ROWE (W.P.) and HUERNER (R.J.) - New viruses observed in children with respiratory diseases.
Public. Hlth. Rep., 1958, 73, (193-195).
- 38 - COOK (M.K.), ANDREWS (B.E.), FOX (N.H.) and TURNER (H.C.) - Antigenic relationships among the "newer" myxoviruses.
Amer. J. Hyg., 1959, 69, (250-264).
- 39 - BUKRINSKAYA (A.G.) - Relations antigéniques dans le groupe des virus p. Influenzae. (en russe).
Voprossi Virusol., 1960, 5, (449-456).
- 40 - FUKUMI (H.) and NISHIKAWA (F.) - Comparative studies of Sendai and HA₂ viruses.
Jap. J. Med. Sci. Biol., 1961, 14, (109-180).
- 41 - ZHDANOV (V.) and BUKRINSKAYA (A.G.) - Further considerations on nomenclature of Parainfluenza virus.
Virology, 1960, 10, (146-149).
- 42 - BUKRINSKAYA (A.G.), HO (Y.D.) and GORBUNOVA (A.S.) - Further investigations on the antigenic relationships between type 2 haemadsorption (HA - 2) and Sendai viruses.
Acta Virologica, 1962, 6, (352-356).
- 43 - DICK (E.C.) and MOGABGAB (W.J.) - Characteristics of parainfluenza I (HA₂) virus.
J. of Bact., 1962, 83, (561-571).

- 44 - COOK (M.K.) and CHANOCK (R.M.) - In vivo antigenic studies of parainfluenza viruses.
Amer. J. Hyg., 1963, 77, (150-159).
- 45 - Mac KINNEY (R.W.) - Studies with hemadsorption virus type I. Recovery from two cases of influenza - like disease military personnel and related investigations.
Amer. J. Hyg., 1959, 70, (280-296).
- 46 - DE MEIO (J.L.) and WALKER (D.L.) - Sendai virus antibody in acute respiratory infections and infectious mononucleosis.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1958, 93, (453-458).
- 47 - PETERSEN (S.) and BIRKUM (K.) - Studies on the properties of a new cytopathogenic and hemagglutinating virus (Copenhagen 222).
Acta Path. and Microb. Scand., 1959, (213-224).
- 48 - ISHIDA (N.), HINUMA (Y.), NUMAZAKI (Y.) and HOMMA (M.) - Common antigens shared by Sendai, mumps and NDV.
Fed. Proc., 1959, 18, (575).
- 49 - NEURATH (A.R.) und ZUFFA (A.) - Gemeinsame antigene Gruppen von Sendai und Newcastle - Disease - virus.
Ztschr. f. Immunitäts-u-Allergie forsch., 1964, 126, (381-391).
- 50 - JENSEN (K.E.), MINUSE (E.) and ACKERMANN (W.W.) - Serological evidence of American experience with newborn pneumonitis virus.
J. Immunol., 1955, 75, (71-77).
- 51 - TARCHILA (D.), ROTHSCHILD (L.), BRONITKI (A.), PETRESCU (A.) et CIRNARU (S.) - Izolarea unei tulpini de virus grippal tip D in Bucuresti.
Studii si Cercetari Inframicrob. Si parazitol., 1958, 2, (187-191).
- 52 - GORBUNOVA (A.S.), GLERIGROSS (O.G.) et GNORIZOVA (V.M.) - Souches de virus grippal D isolées à Vladivostok et leur rôle dans l'étiologie de l'épidémie de 1956. (enrusse).
Voprossi Virusol., 1957, 2, (77-86).
- 53 - ZHDANOV (V.M.), RITOVA (V.V.) et GOLYGINA (L.A.) - Le virus grippal D chez les enfants. (en russe).
Vopr. Virusol., 1957, 4, (243-247).
- 54 - HO (Y.D.) and GORBUNOVA (A.S.) - Antigenic structure of 24 strains of Sendai type I parainfluenza virus.
Problems of Virology., London, 1961, 6, (750-757).
- 55 - ANDREWES (C.H.) - Myxoviruses.
Nature, 1954, 173, (620).

- 56 - ANDREWES (C.H.), BANG (F.B.) and BURNET (F.M.) - A short description of the Myxovirus group (Influenza and related viruses).
Virology, 1955, I, (176-184).
- 57 - ANDREWES (C.H.) - Parainfluenza viruses 1,2,3 : suggested names for recently described myxoviruses.
Virology, 1959, 8, (129-130).
- 58 - ANDREWES (C.H.) - Minute of meeting of the subcommittee on taxonomy of the viruses. Montreal, 1962.
Intern. Bull. Bact. Normal and Taxon., 1963, 13, (217-222).
- 59 - WATERSON (A.P.) - Two kinds of myxovirus.
Nature, 1962, 193, (1163-1164).
- 60 - WATERSON (A.P.) and CRUICKSHANK (J.G.) - Form of the nucleoprotein component as a taxonomic criterion for the myxoviruses.
Nature, 1964, 201, (640-641).
- 61 - COOPER (P.D.) - A chemical basis for the classification of animal viruses.
Nature, 1961, 190, (302-305).
- 62 - REED (L.J.) and MUENCH (H.) - A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
Amer. J. Hyg., 1938, 27, (493-497).
- 63 - BONET-MAURY (P.), JUDE (A.) et SERVANT (P.) - La mesure statistique de la virulence de l'immunité. Application à l'étude de la virulence du bacille typhique et à la mesure du pouvoir immunisant des vaccins antityphoïdiques.
Rev. Immun., 1954, 18, (21-49).
- 64 - MATHIEU (P.), COLBERT (L.), CREACH (O.) et FONTANGES (R.) - Caractères de la cinétique d'hydrolyse de l'acide 3'lactose - lactaminique par Myxovirus Influenzae B.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 101, (817-833).
- 65 - WARREN (L.) - The thiobarbituric acid assay of sialic acids.
J. of Biol. Chem., 1959, 234, (1971-1975).
- 66 - LWOFF (A.) et LWOFF (M.) - Les événements cycliques du cycle viral.
I - Effet de la température.
Ann. Inst. Pasteur, 1961, 101, (469-477).
- 67 - LWOFF (A.) - The thermosensitive critical event of the viral cycle.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 1962, 27, (159-174).

CHAPITRE II

- 68 - SVEDMYR (A.) - Factor in normal allantoic fluid inhibiting influenza virus hemagglutination occurrence, physico chem. properties, and action virus inhibitor interaction.
Brit. J. Exp. Path., 1948, 29, (295-308, 309-321).
- 69 - HARDY (P.H.) and HORSFALL (F.L.) - Reactions between influenza virus and a component of allantoic fluid.
J. of Exp. Med., 1948, 88, (463-483).
- 70 - CUNHA (R.), WEIL (M.L.) and BEARD (D.) - Purification and characters of the Newcastle disease virus.
J. Immun., 1947, 55, (69-89).
- 71 - LANNI (F.) and BEARD (J.W.) - Inhibition by egg - White of hemagglutination by swine influenza virus.
Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med., 1948, 68, (312-313).
- 72 - CHU (L.W.) and MORGAN (H.R.) - Hemolysis of red blood cells by mumps virus hemolysin - I - Developpment of mumps virus hemolysin and its inactivation by certain physic and chem. agents.
J. Exp. Med., 1950, 91, (393-402).
- 73 - COLOBERT (L.) et FONTANGES (R.) - Interférence d'un inhibiteur au cours du développement de Nyrovirus parainfluenzae I (virus Sendai) en oeuf de poule embryonné.
Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, (839-851).
- 74 - LEPINE (P.) et SOHIER (R.) - Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus.
Masson édit. Paris 1954.
- 75 - DAVOLI (R.) - O.M.S., 3 ème cours de Virologie, I. Pasteur Paris, 1958.
- 76 - LANNI (F.) and LANNI (Y.T.) - Influenza virus as enzyme. Mode of action against inhibitory mucoprotein from egg white.
Virology, 1955, I, (40-57).

CHAPITRE III

- 77 - BUZZEL (A.) and HANIG (M.) - Mechanism of hemagglutination by influenza virus.
Advances in Research, 1958, V, (289-340).
- 78 - REINHARD (K.R.) and MAC GRAW (J.C.) - Simple means of obtaining concentration of Influenza haemagglutinating antigen.
J. Bact., 1959, 77, (557-558).

- 79 - VEERARAGHAVAN (N.) and STEEVALSAN (T.) - Evaluation of some methods of concentration and purification of Influenza virus. Bull. Org. Mond. Santé, 1961, 24, (695-702).
- 80 - VEERARAGHAVAN (N.) and STEEVALSAN (T.) - Attempts to increase the yield of influenza virus from stored infected allantoic fluids. Bull. Org. Mond. Santé, 1961, 24, (703-709).
- 81 - MILLER (H.K.) and SCHLESINGER (R.W.) - Differentiation and purification of influenza viruses by adsorption on aluminum phosphate. J. Immun., 1955, 75, (155-175).
- 82 - FROMMAGEN (L.H.) and KNIGHT (C.A.) - Column purification of Influenza virus. Virology, 1959, 8, (198-208).
- 83 - HIRST (G.K.), RIVERS (T.M.) and HORSFALL (F.L.) - Virus - host cells relation in "Viral and rickettsial infections of man". 3.ème édition, Ed. Lippincott, Philadelphia, (96-144).
- 84 - KUDO (H.) - Purification of Sendai virus by adsorption on aluminum phosphate gel. Tohoku J. Exptl., Med., 1962, 77, (278-287).
- 85 - KUDO (H.) - Application of the immunofluorescent technique in testing the purity of Sendai virus. Tohoku J. Exp. Med., 1962, 77, (288-297).
- 86 - SMIRNOVA (G.A.) et LEVYANT (M.I.) - Purification du virus Sendai sur Sephadex. (en russe). Vopr. Virozol., 1963, 8, (514).
- 87 - MATHEKA (H.D.) and ARMERUSTER (O.) - Gradient elution of Influenza viruses from anion exchange resin and demonstration of a biological difference between three components obtained the PR₈ strain. Virology, 1958, 6, (584-600).
- 88 - SCHMIDT (B.), HARTMANN (D.) und GROSSGEBAUER (K.) - Die gewinnung unterschiedlichen H₂magglutininfraktionen aus Influenzaviren mit Hilfe von DEAE - Zellulose - Ionenaustauscher. Arch. Ges. Virusforsch., 1960, 10, (361-367).
- 89 - PHILIPSON (L.), ALBERTSSON (P.A.) and FRICK (G.) - The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems. Virology, 1960, 11, (553-571).
- 90 - POLLEY (J.R.) - The removal of non specific components from the soluble antigens of Influenza and mumps viruses. Canad. J. Microbiol., 1957, 3, (715-719).

- 9I - NICOLI (J.), BETAİL (G.) et COLOBERT (L.) - Adsorption de Myxovirus parainfluenzae I sur cellulose, la diéthyl aminoéthylcellulose, la diazobenzylcellulose et la cellulose couplée par diazotation au mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf. Application à la purification du virus.
Ann. Inst. Pasteur, 1964, 107, (192-202).
- 92 - COX (C.D.) and PIRTLE (E.C.) - Titration of influenza virus and viral antibodies by preserved human erythrocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1956, 93, (373-76).
- 93 - BRAND (G.) und LIPPELT (H.) - Über den Influenza - Virus - Rezeptor formalinisierter Erythrocyten.
Arch. Ges. Virusforsch., 1955, 6, (134-142).
- 94 - BUCKLAND (F.E.) - Impairment of viral haemagglutination of Red cells after treatment with formalin.
Nature, 1959, 183, (1276).
- 95 - INGRAHAM (J.S.) - The preparation and use of formalinized erythrocytes with attached antigens or haptens to titrate antibodies.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1958, 99, (452-456).
- 96 - GOLD (E.R.), LOCKYER (W.J.) and TOVEY (G.T.) - Use of lyophilized formol - treated red cells in blood - group serology.
Nature, 1958, 182, (951).
- 97 - BARUA (D.) et FAUCONNIER (B.) - Elution non enzymatique du virus grippal.
Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, (479-496).
- 98 - FROMMHAGEN (L.H.), KNIGHT (C.A.) and FREEMAN (N.K.) - The ribonucleic acid, lipid and polysaccharide constituents of influenza virus preparation.
Virology, 1959, 8, (176-197).
- 99 - FONTANGES (R.) - De l'utilisation du spectre infrarouge des micro-organismes entiers en vue de leur identification. (2ème thèse Sciences)
- I00 - POLLARD (M.), ENGLEBY (F.B.), REDMOND (R.F.), CHINN (H.T.) and MITCHELL (R.B.) - Infrared absorption spectra of viruses.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1952, 81, (10-11).
- I01 - BENEDICT (A.A.) - Group classification of virus preparations by infrared spectroscopy.
J. Bact., 1955, 69, (264-269).
- I02 - SIEGEL (B.V.), FREEMAN (K.K.) and BOSTICK (W.L.) - Infrared absorption studies of purified normal and virus infected mouse brains.
J. Bact., 1957, 74, (695-696).

- I03 - BENEDICT (A.A.) - Study of virus preparations by infrared spectroscopy.
Ann. N.Y. Acad. Sciences, 1957, 69, (158-170).
- I04 - TAVERNE (J.), MARSCHALL (J.H.) and FULTON (F.) - The purification and concentration of viruses and virus soluble antigens on calcium phosphate.
J. Gen. Microbiol., 1958, 19, (451-461).
- I05 - COX (H.R.), Van der SCHEER (J.), AISTON (S.) and BOHNEL (E.) - The purification and concentration of influenza virus by means of alcohol precipitation.
J. Immunol., 1947, 56, (149-166).
- I06 - HOYLE (L.) - Structure of the influenza virus. The relation between biological activity of chemical structure of virus fractions.
J. Hyg., 1952, 50, (229-245).
- I07 - FRISCH-NIGGEMEYER (W.) - Über die chemische Zusammensetzung und die innere struktur des Influenzavirus unter besonderer Berücksichtigung des sogenannten "löslichen antigens".
Zbl. Bakt. Parasit. Infekt., 1961, 183, (294-317).
- I08 - LIEF (S.F.) and HENLE (W.) - Studies on the soluble antigens of influenza virus.
Virology, 1956, 2, (753-771, 772-781, 782-797, 798).
- I09 - BLASKOVIC (D.) - Some properties of g-antigen and haemagglutinin of the influenza virus.
Report on the fourth Intern. Congress of Biochemistry. Vienne, 1958, (152-155).
- II0 - HOYLE (L.), HORNE (R.W.) and WATERSON (A.P.) - The structure and composition of the myxoviruses - II - Components released from the Influenza virus particle by ether.
Virology, 1961, 13, (448-459).
- III - HOYLE (L.), HORNE (R.W.) and WATERSON (A.P.) - III - The interaction of influenza virus particles with cytoplasmic particles derived from normal chorioallantoic membrane cells.
Virology, 1962, 17, (533-542).
- II2 - HOYLE (L.) - The entry of Myxoviruses into the cell.
in "Basic mechanisms in animal virus biology", Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biol., 1962, 27, (113-121).

CHAPITRE IV

- II3 - HIRST (G.K.) and PICKELS (E.G.) - A method for titration of influenza hemagglutinin and influenza antibodies with the aid of a photoelectric densitometer.
J. Immun., 1942, 45, (273-283).
- II4 - HIRST (G.K.) - The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination.
J. Exp. Med., 1942, 75, (49-64).
- II5 - HIRST (G.K.) - The nature of the virus receptors of red cells.
I - Evidence on the chemical nature of the virus receptors of red cells and of the existence of a closely analogous substance in normal serum.
J. Exp. Med., 1948, 87, (307-328).
- II6 - BURNET (F.M.) - Mucoproteins in relation to virus action.
Physiol. revs., 1951, 31, (131-150).
- II7 - GOTTSCHALK (A.) - The product of interaction between influenza virus enzyme and ovomucin.
Intern. Cong. Biochem. Cambridge, 1949, (317-319).
- II8 - GOTTSCHALK (A.) and LIND (P.E.) - idem.
Nature, 1949, 164, (232-233).
- II9 - GOTTSCHALK (A.) and PERRY (L.T.) - Ovomucin, a substrate for the enzyme of the influenza virus particle.
Brit. J. Exp. Path., 1951, 32, (408-413).
- I20 - CURTAIN (C.C.) and PYE (J.) - A mucoprotein from bovine submaxillary glands with restricted inhibitory action against influenza virus haemagglutination.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sc., 1955, 33, (315-322).
- I21 - BLIX (G.) - Über die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarmucins.
Z. Physiol. Chem., 1936, 211, (43-55).
- I22 - GOTTSCHALK (A.) - 2-Carboxypyrrole : its preparation from and its precursor in mucoprotein.
Biochem. J., 1955, 61, (298-307).
- I23 - GOTTSCHALK (A.) - Presence of 2-carboxypyrrole in mucoproteins and its relation to the viral enzyme.
Nature, 1953, 172, (808).
- I24 - GOTTSCHALK (A.) - Structural relation between sialic acid, neuraminic acid and 2-carboxypyrrole.
Nature, 1955, 176, (881-882).

- I25 - GOTTSCHALK (A.) - Synthesis of 2-carboxypyrrole from D-glucosamine and pyruvic acid : its bearing on the structure of neuramini^e acid. Arch. Bioch. Biophys., 1957, 69, (37-44).
- I26 - GOTTSCHALK (A.) and GRAHAM (E.R.B.) - 6- α -D-sialic-N-acetylgalactosamine : the neuraminidase-susceptible prosthetic group of bovine salivary mucoprotein. B.B.A., 1959, 34, (380-391).
- I27 - TSUIKI (S.), HASHIMOTO (Y.) and PIGMAN (W.) - Bovine submaxillary mucin. Nature, 1961, 189, (399).
- I28 - PIGMAN (W.) and HASHIMOTO (Y.) - Composition of bovine submaxillary mucins. B.B.A., 1963, 69, (579-580).
- I29 - HEIMER (R.) and MEYER (K.) - Sialic acid of submaxillary mucoid. Proc. Nat. Acad.Sci., 1956, 42, (728-734).
- I30 - WHITE (J.C.), ELMES (P.C.) and WHITLEY (W.) - Mucoprotein of bronchial mucus gel. Nature, 1959, 183, (1810-1811).
- I31 - ADA (G.L.) and GOTTSCHALK (A.) - Preparation from urine of a pure substrate (mucoprotein) for the influenza virus enzyme. Austr. J. Biol. Med. Sci., 1952, 14, (160-168).
- I32 - GOTTSCHALK (A.) - N-substituted isoglucosamine released from mucoproteins by the influenza virus enzyme. Nature, 1951, 167, (845-47).
- I33 - GOTTSCHALK (A.) - The influenza virus enzyme and its mucoprotein substrate. Yale J. Biol. Med., 1954, 26, (352-364).
- I34 - KLENK (E.), FAILLARD (H.) und LEMPPFRID (H.) - Uber die enzymatische Wirkung von Influenza Virus. Z. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's, 1955, 301, (235-246).
- I35 - TAMM (I.) and HORSFALL (F.L.) - A mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps and NDV. J. Exptl. Med., 1952, 95, (71-97).
- I36 - SVENNERHOLM (L.) - On the isolation and characterization of N-acetyl sialic acid. Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1956, 61, (75-85).
- I37 - GRAHAM (E.R.B.) and GOTTSCHALK (A.) - The structure of the prosthetic group of ovine submaxillary gland mucoprotein. B.B.A., 1960, 38, (513-523).

- I38 - GOTTSCHALK (A.) - Correlation between composition, structure, shape and function of a salivary mucoprotein. Nature, 1960, 186, (949-951).
- I39 - ZILLIKEN (F.), WERNER (G.H.), SILVER (R.K.) and GYORGY (P.) - Studies on the enzymatic properties of Influenza viruses. The action of Influenza B virus and RDE on the hemagglutinin inhibitor of human meconium. Virology, 1957, 3, (464-474).
- I40 - KUHN (R.) und BROSSMER (R.) - Über die prosthetische Gruppe der Mucoproteine des Kuh Colostrums. Chem. Bericht., 1954, I, (I23-I27).
- I41 - KUHN (R.) und BROSSMER (R.) - Über O-acetyl - lactaminsäure lactose aus Kuh - Colostrum und ihre Spaltbarkeit durch Influenza virus. Chem. Bericht., 1956, 2, (2013-2025).
- I42 - KUHN (R.) und BROSSMER (R.) - Über das durch Viren den Influenza Gruppe spaltbare trisaccharide der Milch. Chem. Bericht., 1959, 6, (I667-I674).
- I43 - KUHN (R.) und BROSSMER (R.) - Die Konstitution der Lactaminsäure - lactose, α -cetosidase Wirkung von Viren der Influenza Gruppe. Angew. Chem., 1958, I, (25-26).
- I44 - KUHN (R.) und BROSSMER (R.) - Zur Konfiguration der Lactaminsäure. Liebigs Am. Chem., 1958, 616, (221-225).
- I45 - KUHN (R.) - Les Oligosaccharides du lait. Bull. Soc. Ch. Biol., 1958, 40, (297-314).
- I46 - ZILLIKEN (F.), BRAUN (G.A.) and GYORGY (P.) - Gynaminic acid. A naturally occuring form of neuraminic acid in human milk. Arch. Biochem. Biophys., 1955, 54, (564-570).
- I47 - ZILLIKEN (F.), BRAUN (G.A.) and GYORGY (P.) - Gynaminic acid and other naturally occuring forms of N-Acetylneuraminic acid. J. Biol. Chem., 1956, 63, (394-402).
- I48 - HEIMER (R.) and MEYER (K.) - Sialido - lactose of cowcolostrum. B.B.A., 1958, 27, (490-494).
- I49 - CLARK (W.R.), JACKSON (R.H.) and PALLAUSCH (M.J.) - The isolation of sialic acid in high yield from colostrum. B.B.A., 1962, 58, (I29-I30).
- I50 - SCHMIDT (E.) - Grippevirusheimmstoffe in Frauenmilch und Kuhmilch. Z. Kind., 1960, 84, (339-348).

- I51 - MARTENSSON (E.), RAAL (A.) and SVENNERHOLM (L.) - Sialic acids in blood serum.
B.B.A., 1958, 30, (I24-I29).
- I52 - WEISS (L.) - Sialic acid as a structural component of some mammalian tissue cell surfaces.
Nature, 1961, 191, (1108-1109).
- I53 - CARUBELLI (R.), TRUCCO (R.E.) and CAPUTTO (R.) - Neuraminidase activity in mammalian organs.
B.B.A., 1962, 60, (196-197).
- I54 - LAUCIKOVA (O.) - Purification and some properties of the inhibitor of virus haemagglutination from chorio allantoic membranes of the chick embryo.
Acta Virologica, 1957, 2, (7-10).
- I55 - TESS (B.R.) and KEMPF (J.E.) - Decrease of bound sialic acid and inhibitor in chorioallantoic membranes infected with influenza virus.
J. Bact., 1963, 86, (239-245).
- I56 - BARRY (G.T.), TSAI (T.H.) and CHEN (F.P.) - Chemical and serological relation chips of certain bacterial polysaccharides containing sialic acid.
Nature, 1960, 185, (597-598).
- I57 - DEWITT (C.W.) and ROWE (J.A.) - Sialic acids in Escherichia coli.
J. of Bact., 1961, 82, (838-848).
- I58 - KLENK (G.) and LAUENSTEIN (K.) - Isolation of neuraminic acid as a cleavage product.
Z. Physiol. Chem., 1952, 291, (147-152).
- I59 - KLENK (E.) und FAILLARD (H.) - Isolierung von N-acetyl-neuramininsäure aus Fetus
Deutsche Z. Verd. Stoffwechselkrankheiten., 1957, 17, (51-62).
- I60 - GOTTSCHALK (A.) and ADA (G.L.) - Separation and determination of the component sugars of mucoproteins.
Bioch. J., 1956, 62, (681-686).
- I61 - GOTTSCHALK (A.) - The linkage of sialic acid in mucoprotein.
B.B.A., 1956, 20, (560-561).
- I62 - GOTTSCHALK (A.) - The chemistry of neuraminic acid and its derivatives.
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1956, 18, (178-182).
- I63 - GOTTSCHALK (A.) - Neuraminic acid : the functional group of some biologically active mucoproteins.
Yale J. Biol. Med., 1956, 28, (525-527).

- I64 - GOTTSCHALK (A.) - Neuraminidase : the specific enzyme of influenza virus and vibrio cholerae.
B.B.A., 1957, 23, (645-646).
- I65 - GOTTSCHALK (A.) - Structure of the prosthetic group of bovine submaxillary gland mucoprotein.
B.B.A., 1957, 24, (649-650).
- I66 - GOTTSCHALK (A.) - Neuraminidase : its substrate and mode of action.
Advances in Enzymology, 1958, 20, (135-145).
- I67 - BRUG (J.) and PAERELS (G.B.) - Configuration of N-acetylneuraminic acid.
Nature, 1958, 182, (1159-1160).
- I68 - SVENNERHOLM (L.) - Estimation of sialic acids : II - Colorimetric resorcinolhydrochloric acid method.
B.B.A., 1957, 24, (604-611).
- I69 - SVENNERHOLM (L.) - III - An anion exchange resin method.
Acta Chem. Scand., 1958, 12, (547-554).
- I70 - SVENNERHOLM (E.) and SVENNERHOLM (L.) - Quantitative paper partition chromatography of sialic acids.
Nature, 1958, 181, (1154-1155).
- I71 - COMB (D.G.) and ROSEMAN (S.) - Composition and enzymic synthesis of N-acetyl-neuraminic acid.
J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, (497-499).
- I72 - CORNFORTH (J.W.), DAINES (M.E.) and GOTTSCHALK (A.) - Synthesis of N-acetyl- neuraminic acid.
Proceed. of the Chemical Society, 1957, Janvier (25-26).
- I73 - CORNFORTH (J.W.), FIRTH (M.E.) and GOTTSCHALK (A.) - Synthesis of N-acetyl-neuraminic acid.
Bioch. J., 1958, 68, (57-61).
- I74 - DUMAS (R.) et ALAIS (C.) - Préparation de l'acide N-Acétyle-Neuraminique cristallisé à partir de la caséine de vache.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, (377-385).
- I75 - BLIX (C.), GOTTSCHALK (A.) and KLENK (E.) - Proposed nomenclature in the field of neuraminic acid and sialic acids.
Nature, 1957, 179, (1088).
- I76 - GOTTSCHALK (A.) - The influenza neuraminidase.
Nature, 1958, 181, (377-378).
- I77 - WERNER (I.) and BLIX (G.) - Recent studies on sialic acids.
Bull. Soc. Chim. Belge, 1956, 65, (202-206).

- I78 - STACEY (M.) - Les acides nonulosaminiques-complexes de sucres et acides aminés.
Endeavour, 1960, XIX, (43-49).
- I79 - BLIX (G.), LINDBERG (E.), ODIN (L.) and WERNER (I.) - Sialic acids.
Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1956, 61, (1-24).
- I80 - POPENOF (E.A.) - The linkage of neuraminic acid in orosomucoïd.
B.B.A., 1959, 32, (584-585).
- I81 - KLENK (E.) und STOFFEL (W.) - Zur Kenntnis der Zellrezeptoren für das Influenza virus - Über das Vorkommen von Neuraminsäure im Eiweiss des Erythrocytenstromas.
Z. Physiol. Chem., 1956, 30, (78-80).
- I82 - HOWE (C.), ROSE (H.M.) and SCHNEIDER (L.) - Enzymic action of Influenza virus on human erythrocyte stroma components.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1957, 96, (88-94).
- I83 - KLENK (E.) und UHLENBRUCK (G.) - Über ein neuraminsäurehaltiges mucoproteid aus rindererythrocyten stroma.
Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. Dtsch., 1958, 311, (227-233).
- I84 - KATHAN (R.H.), WINZLER (A.J.) and JOHNSON (C.A.) - Preparation of an inhibitor of viral hemagglutination from human erythrocytes.
J. Exp. Med., 1961, 113, (37-45).
- I85 - KATHAN (R.H.) and WINZLER (A.J.) - Structure studies on the myxo-virus hemagglutination inhibitor of human erythrocytes.
J. Biol. Chem., 1963, 238, (21-25).
- I86 - TISCHER (I.) - Über die Bedeutung des Neuraminsäure - Gehaltes den erythrocyten - oberfläche für die haemagglutination durch influenzavirus.
Arch. Ges. Virusforsch., 1963, 12, (620-631).
- I87 - KAWAMURA (K.) - Production and purification of R.D.E. Studies on several inhibitors against influenzae viruses.
Tohoku J. Exp. Med., 1958, 67, (372-375).
- I88 - ADA (G.L.) and French (E.L.) - Purification of bacterial neuraminidase.
Nature, 1959, 183, (1740-41).
- I89 - SCHRAMM (G.) and MOHR (E.) - Purification of Neuraminidase from vibrio cholerae.
Nature, 1959, 183, (1677-78).
- I90 - FRENCH (E.L.) and ADA (G.L.) - Stimulation of the production of neuraminidase in vibrio cholerae cultures by N.A.N.A. and sialyl-lactose.
J. Gen. Microbiol., 1959, 21, (550-560).

- I91 - ADA (G.L.), FRENCH (E.L.) and LIND (P.E.) - Purification and properties of neuraminidase from vibrio cholerae. J. Gen. Microbiol., 1961, 24, (409-421).
- I92 - PYE (J.) and CURTAIN (C.C.) - Electrophoretic, sedimentation and diffusion behaviour of crystalline neuraminidase from vibrio cholerae. J. Gen. Microbiol., 1961, 24, (423-425).
- I93 - LAVER (W.G.), PYE (J.) and ADA (G.L.) - The molecular size of neuraminidase from vibrio cholerae (strain 4 Z). B.B.A., 1964, 81, (177-180).
- I94 - NOLL (H.), AOYAGI (T.) and ORLANDO (J.) - Intercellular synthesis of neuraminidase following infection of chorioallantoic membranes with Influenza virus. Virology, 1961, 14, (140-143).
- I95 - NOLL (H.), AOYAGI (T.) and ORLANDO (J.) - The structural relationship of sialidase to the influenza virus surface. Virology, 1962, 18, (154-157).
- I96 - RAFELSON (M.E.), SCHNEIR (M.) and WILSON (V.W.) - Studies on the neuraminidase of influenza virus. II - Additional properties of the enzymes from the Asian and PR₈ strains. Arch. of Bioch. and Bioph., 1963, 103, (424-430).
- I97 - WILSON (V.W.) and RAFELSON (M.E.) - Isolation of neuraminidase from influenza virus. Biochemical preparations, 1963, 10, (113-117).
- I98 - BRIODY (B.A.) and HANIG (M.) - Lack of action influenza virus on mucin of human or swine origin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 67, (485-487).
- I99 - WOOLEY (D.W.) - Purification of an influenza virus substrate, and demonstration of its competitive antagonism to apple pectin. J. Exp. Med., 1949, 89, (11-22).
- 200 - ECKERT (E.A.), LANNI (F.) and BEARD (D.) - Effect of swine Influenza virus on the viscosity of the egg white inhibitor of hemagglutination. Science, 1949, 109, (463-464).
- 201 - TAMM (I.), BUGHER (J.C.) and HORSFALL (J.) - Ultracentrifugation studies of a urinase M.P. which reacts with various virus. J. Biol. Chem., 1955, 212, (125-133).
- 202 - CURTAIN (C.C.) - The viscosimetric behaviour of a mucoprotein isolated from human urine. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1953, 31, (255-256).

- 203 - CURTAIN (C.C.) - Action of urea on the urinary of infl. virus hemagglutination.
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1953, 31, (615-622).
- 204 - BURNEY (F.M.) and EDNEY (M.) - Influence of ions on the interaction of influenza virus and cellular receptors or soluble inhibitors of haemagglutination.
Austr. J. Exp. Biol., 1952, 30, (108-117).
- 205 - PERLMANN (G.), TAMM (I.) and HORSFALL (F.L.) - An electrophoretic examination of a urinary mucoprotein which reacts with various viruses.
J. Exp. Med., 1952, 95, (99-104).
- 206 - COLOBERT (L.) et FANTANGES (R.) - Activité neuraminidasique des Myxovirus influenzae A et B et de Myxovirus parainfluenzae I sur le mucopolysaccharide de la glande sous maxillaire de boeuf. Effet sur la viscosité.
Ann. Inst. Pasteur, 1963, 104, (734-745).
- 207 - LECOMTE DU NOUY (P.) et HAMON (V.) - La viscosité des mélanges toxine-anti - toxine diphtérique.
Ann. Inst. Pasteur, 1936, 56, (359-375).
- 208 - GOTTSCHALK (A.) - The chemistry and biology of sialic acids and related substances.
Cambridge University press, 1960, (I-II5).

CHAPITRE V

- 209 - MAYRON (L.W.) and TOKES (Z.A.) - Preparation of neuramin-lactose from bovine colostrum.
B.B.A., 1960, 45, (601-603).
- 210 - SAROJA (K.), VENKATARAMAN (R.) and GIRI (K.V.) - Transglucosidation in *Penicillium chrysogenum* Q-176, Isolation and identification of the oligosaccharides.
Biochem. J., 1955, 60, (399-403).
- 211 - BLOCK (R.J.), DURRUM (E.L.) and ZWEIG (G.) - Manual of paper chromatography and paper electrophoresis. Academic Press, N.Y., 1958, (194).
- 212 - SCOTT (T.A.) and MELVIN (E.H.) - Determination of dextran with anthrone.
Analytical Chem., 1953, 25, (1656-1661).
- 213 - NELSON (N.) - A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.
J. Biol. Chem., 1944, 153, (375-380).

- 214 - HESTRIN (S.) - The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. J. Biol. Chem., 1949, 180, (249-261).
- 215 - LUDOWIEG (J.) and DORFMAN (A.) - A micromethod for the colorimetric determination of N-acetyl groups in acid mucopolysaccharides. B.B.A., 1960, 38, (212-218).
- 216 - JACOBS (J.) and WALOP (J.M.) - Determination of the concentration of myxoviruses and some specific antisera, based on neuraminidase activity. Nature, 1961, 189, (334).
- 217 - MICHAELIS (L.) and MENTEN (M.L.) - Effect of substrate concentration. in Enzymes, M. DIXON and E.C. WEBB, Longmans, Green and Co, London, N.Y., Toronto, 1958, (73-77).
- 218 - WALOP (J.N.), BOSCHMAN (T.A.C.) and JACOBS (J.) - Affinity of N.A.N.A. for influenza virus neuraminidase. B.B.A., 1960, 44, (185-186).
- 219 - MAYRON (L.W.), ROBERT (B.), WINZLER (A.J.) and RAFELSON (M.E.) - Studies on the neuraminidase of Influenza virus. I - Separation and some properties of the Enzyme from Asian and PR₈ strains. Arch. Biochem. Bioph., 1961, 92, (475-483).

CHAPITRE VI

- 220 - LEVINE (S.), PUCK (T.T.) and SAGIK (B.P.) - An absolute method for assay of virus hemagglutinins. J. Exp. Med., 1953, 98, (521-5).
- 221 - HORSFALL (F.L.) - On the reproduction of Influenza virus. Quantitative studies with procedures which enumerate infective and hemagglutinating virus particles. J. Exp. Med., 1954, 100, (135-161).
- 222 - DRESCHER (J.) - Über Hämagglutinin und Antikörpergehalts - bestimmungen IV - Mitteilung : Beschreibung eines photometrischen Verfahrens zur Bestimmung von spezifisch und unspezifisch die Hämagglutination hemmenden Antikörpern. Zentr. f. Bakt. I., 1958, 173, (185-195).
- 223 - DRESCHER (J.) - Über hemagglutinin und Antikörper gehaltsbestimmungen : untersuchungen über die reaktion zwischen virus und spezifisch die hämagglutination hemmenden antikörpern bei den Influenzavirusstämmen. Zbl. Bakt., 1959, 175, (485-504).

- 224 - DRESCHER (J.), HENNESSY (A.V.) and DAVENPORT (F.M.) - Photometric for the measurement of hemagglutinating viruses and antibody. I - Further experiences with a novel photometric method for measuring hemagglutinins. II - Further experiences with antibody determinations and the description of a technique for analysis of virus mixtures.
J. Immunol., 1962, 89, (794-804, 805-814).
- 225 - SCHMIDT (G.) - Erfahrungen mit der photometrischen Virusgehaltsbestimmung nach Drescher bei verschiedenen Myxoviren.
Zbl. Bakt. Parasit. infekt. Krankh. hyg. I. Deutsch., 1959, 176, (334-341).
- 226 - SCHREIER (C.) - Aufnahme der Adsorptionsisotherme für die Reaktion zwischen Hämagglutinin und der hämagglutination-Semmenden Antikörpern für die Influenza-Virusstämme A/Swine, A/WS, B/Lee und AI/FM_I.
Zentr. f. Bakt., 1961, 182, (443-458).
- 227 - TISCHER (I.) - Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der haemagglutination und die beziehung zwischen oberflächenladung und receptoraffinität einiger myxoviren.
Arch. Ges. Virusforsch., 1962, 12, (89-107).
- 228 - COLOBERT (L.), FONTANGES (R.) et DUFFRENE (A.) - Une nouvelle méthode photométrique de titrage du pouvoir hémagglutinant des Myxovirus -I- Virus grippal B.
C.R. Séances Soc. Biol., 1959, CLIII, (428-431).
- 229 - COLOBERT (L.), FONTANGES (R.) et DUFFRENE (A.) - Une nouvelle méthode photométrique de titrage du pouvoir hémagglutinant des myxovirus -II- Interprétation théorique.
C.R. Séances Soc. Biol., 1959, CLIII, (631-634).
- 230 - COLOBERT (L.) et FONTANGES (R.) - Titrage de l'activité hémagglutinante et de l'activité enzymatique de Myxovirus parainfluenzae 1 (virus Sendaï).
C.R. Séances Soc. Biol., 1959, CLIII, (1382-1386).
- 231 - FAUCONNIER (B.) and BARUA (D.) - Increase of viral haemagglutination of red cells of the mouse after treatment with formalin.
Nature, 1959, 183, (629-630).
- 232 - FAUCONNIER (B.) - Modification de la réceptivité des hématies animales et humaines aux agglutinines grippales et ourliennes après traitement de ces globules rouges par le formol.
Ann. Inst. Pasteur., 1960, 98, (107-118).

CHAPITRE VII

- 233 - MORGAN (H.R.) ENDERS (J.F.) and WAGLEY (P.F.) - A hemolysin associated with the mumps virus.
J. of Exp. Med., 1948, 88, (503-513).
- 234 - KILHAM (L.) - A Newcastle disease virus hemolysin.
Proceed. Soc. Exp. Biol. and Med., 1949, 71, (63-66).
- 235 - BURNET (F.M.) - Haemolysis by NDV between virus and red cell.
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1950, 28, (299-309).
- 236 - BURNET (F.M.) - Haemolysis by NDV. II - General character of hemolytic action.
Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1950, 28, (129-150).
- 237 - FUKAI (K.) and SUZUKI (T.) - On the characteristics of a newly isolated hemagglutinating virus from mice.
Med. J. Osaka Univ., 1955, 6, (1-15).
- 238 - SATO (S.) and YUKINO (H.) - On the haemolytic characteristics of Sendai virus.
Virus, 1958, 8, (48-58).
- 239 - YOSHIDA (M.) - Studies on the hemolytic activity of HWJ.
Virus, 1958, 8, (310-314).
- 240 - MUSSGAY (M.) and LEDERHILGER (G.) - Hemagglutination and hemolysis by an egg adapted strain of the eastern type of the American equine encephalomyelitis virus.
Zentr. Veterinärmed., 1957, 4, (243-260).
- 241 - KARABATSOS (N.) - Hemolytic properties of eastern and western equine encephalomyelitis viruses.
J. Immun., 1963, 91, (76-82).
- 242 - HERMODSSON (S.), DINTER (Z.) and BAKOS (K.) - Studies on variants of a bovine strain of parainfluenza 3 virus.
Acta Path. Microbiol. Scand., 1961, 51, (75).
- 243 - NORREY (E.) and FALKSVEDEN (L.G.) - Some general properties of the measles virus hemolysin.
Arch. Ges. Virusforsch., 1964, 14, (474-486).
- 244 - Mac COLLUM (W.H.) and BRANDLY (C.A.) - Hemolytic activity of Newcastle disease virus.
Amer. J. Vet. Res., 1955, 16, (584-592).
- 245 - ATANASIU (P.), EDIPIDES (T.) and BASSET (J.) - Hemolysin of Newcastle virus.
Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, (523-530).

- 246 - KAHNKE (M.J.) - A hemolysis inhibition test for the detection of antibodies to Newcastle disease virus.
J. Immun., 1951, 66, (507-513).
- 247 - GRANOFF (A.) and HENLE (W.) - Studies on the hemolytic activity of Newcastle disease virus.
J. Immun., 1954, 72, (322-328).
- 248 - GRANOFF (A.) and HENLE (W.) - Studies on the interaction of the large and small components of N.V.D. with red cells.
J. Immun., 1954, 72, (329-339).
- 249 - SAGIK (B.P.) and LEVINE (S.) - The interaction of Newcastle disease virus with chicken erythrocytes: attachment, elution, hemolysis.
Virology, 1957, 3, (401-406).
- 250 - MACPHERSON (L.W.) and SWAIN (R.H.A.) - Strain differences in the Newcastle disease virus.
The J. of Hyg., 1956, 54, (234-245).
- 251 - NEURATH (A.R.) - Spektrophotometrische untersuchung über die Reaktion zwischen hämolytischen Virus and spezifisch die Hämolysen hemmenden antikörpern bei dem Virus der atypischen Geflügelpest.
Z. Immun. Forsch. Dtsch., 1962, 124, (164-172).
- 252 - HOSAKA (Y.) - On the hemolytic activity of HVJ. -I- An analysis of the hemolytic reaction.
Biken's J., 1958, I, (70-89).
- 253 - NEURATH (A.R.) and SOKOL (F.) - Haemolysis by Sendaï virus.
Acta Virol., 1961, 5, (327).
- 254 - NEURATH (A.R.) and SOKOL (F.) - Subunits of Myxoviruses - IV - Haemolysin of parainfluenza I virus.
Acta Virol., 1962, 6, (66-75).
- 255 - ZIJLSTRA (W.G.) and VAN KEMPEN (E.J.) - Standardization of hemoglobinometry I - The extinction coefficient of hemoglobin cyanide at 540 mμ.
Clin. Chim. Acta, 1960, 5, (719-721).
- 256 - HO (Y.D.) - Technique de la réaction d'hémolyse et de la réaction d'inhibition de l'hémolyse avec des virus doués d'activité hémolytique. (en russe).
Lab. Dejo, 1963, 2, (41-43).
- 257 - CHABERT (A.), FONTANGES (R.) et COLOBERT (L.) - Etude cinétique de l'hémolyse provoquée par Myxovirus parainfluenzae I.
Ann. Inst. Pasteur, 1964, 107, (458-471).

- 258 - WILBUR (K.M.) and COLLIER (H.B.) - A comparison of the hemolytic actions of lysolecithin and saponin.
J. of Cellular and comparative Physiology. 1943, 21, (233-249).
- 259 - COLLIER (H.B.) - Factors affecting the hemolytic action of lysolecithin upon rabbit erythrocytes.
J. of Gen. Physiol., 1952, 35, (617-628).
- 260 - MAENO (H.), MITSUHASHI (S.), OKONOJI (T.), HOSHI (Sh.) and HOMMA (M.) - Studies on habu snake venom.
Jap. J. exp. Med., 1962, 32, (55-64).
- 261 - BERNHEIMER (A.W.) - Comparative kinetics of hemolysis induced by bacterial and other hemolysins.
J. of Gen. Physiol., 1947, 13, (337-353).
- 262 - COOPER (L.Z.), MADOFF (M.A.) and WEINSTEIN (L.) - Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alphatoxin -I- Kinetics of the lytic reaction.
J. of Bact., 1964, 87, (127-135).
- 263 - MANGALO (R.) et RAYNAUD (M.) - Etude cinétique de l'hémolyse des hématies de lapin par la toxine staphylococcique α .
Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, (188-197).
- 264 - PUCK (T.T.) and LEE (H.H.) - Mechanism of cell wall penetration by viruses.
J. Exp. Med., 1954, 99, (481-494).

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I

- 265 - DOUSTE-BLAZY (L.) - Lipides des hématies.
Exposés annuels de Biochimie Médicale, 1959, 21, (187-211).
- 266 - KLEMPERER (H.G.) - Hemolysis and the release of potassium from cells by Newcastle Disease Virus.
Virology, 1960, 12, (540-552).
- 267 - KNICHT (C.A.) - The lipids of animal viruses.
Protoplasmatologia. 1963, Wien Springer Verlag, (24-26).
- 268 - KATES (M.), ALLISON (A.C.), TYRELL (D.A.J.) and JAMES (A.T.) - Lipids of influenza virus and their relation to those of the host cell.
B.B.A., 1961, 52, (455-466).

- 269 - KATES (M.), ALLISON (A.C.), TYRELL (D.A.J.) and JAMES (A.T.) - Origin of lipids in influenza virus. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1962, 27, (293-301).
- 270 - FRANKLIN (R.M.) - An hypothesis to explain the relation between the synthesis and release of animal viruses from infected cells and the lipid content of the viruses. Experientia, 1958, 14, (346-348).
- 271 - FRANKLIN (R.M.) - The significance of lipids in animal viruses. in Progress in Medical Virology, Karger, Basel/N.Y., 1962, 4, (I-53).
- 272 - MATSUMOTO (T.) and MAENO (K.) - A host induced modification of hemagglutinating virus of Japan in its hemolytic and cytopathic activity. Virology, 1962, 17, (563-570).
- 273 - MORIMOTO (M.) and MORGAN (H.R.) - Effect of lecithin, cholesterol, cardiolipin on mumps virus hemolysin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 86, (795-800).
- 274 - DOMONKOS (J.) - Wirkung verschiedener Lipoide auf die Lysolecithin hämolyse. Hoppe-Seyler's Zeits. Physiol. Chem., 1962, 327, (278-279).
- 275 - GARDNER (B.J.) and MORGAN (H.R.) - Effect of certain enzyme inhibitors on hemolytic and hemagglutinating activity of mumps virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 79, (I33-I35).
- 276 - MOBERLY (M.L.), MARINETTI (G.V.), WITTER (R.F.) and MORGAN (H.R.) - Studies of the hemolysis of red blood cells by mumps virus. J. Exp. Med., 1958, 107, (87-94).
- 277 - HOSAKA (Y.) - On the hemolytic activity of HVJ. -II- Decrease of sphingomyelin in red blood cells hemolysed by H.V.J. Biken's J., 1958, 1, (90-99).
- 278 - HOSAKA (Y.) - III - Further analysis on the decrease in the cell sphingomyelin contents by HVJ and NDV. Biken's J., 1960, 3, (I-10).
- 279 - SOULE (D.W.), MARINETTI (G.V.) and MORGAN (H.R.) - Studies of the hemolysis of red blood cells by mumps virus. IV - Quantitative study of changes in red blood cell lipids and of virus lipids. J. Exp. Med., 1959, 110, (93-102).
- 280 - TURNER (J.C.) and PARSONS (E.A.) - Absence of lecithin from the stromata of the red cells of certain animals and its relation to venom hemolysis. J. Exp. Med., 1957, 105, (189-193).

- 281 - REBEL (G.), FONTANGES (R.) et COLOBERT (L.) - Nature lipidique des substances responsables de l'activité hémolytique de Myxovirus parainfluenzae I.
Ann. Inst. Pasteur, 1962, 102, (137-152).
- 282 - FONTANGES (R.), HERITIER (P.) et COEUR (P.) - Une méthode de microspectrographie infrarouge applicable aux lipides.
Bull. Soc. Chimie Biol., 1964, 46, (1223-1227).
- 283 - FOLCH (J.), LEES (M.), STANLEY (G.H.S.) - A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.
J. Biol. Chem., 1957, 226, (497-509).
- 284 - THIELE (O.W.) - Abspaltung von Plasmal in wässrigen Phosphatid - Solen.
Naturwiss., 1958, 45, (628-629).
- 285 - STAHL (E.) - Dünnschichtchromatographie. eine adsorptionschromatographische Schnell methode unter besonderer Berücksichtigung der Untersuchung von Lipiden.
Fette, Seifen, Austringmittel, 1958, 60, (1027-1034).
- 286 - LEA (C.H.), RHODES (D.N.) and STOLL (R.D.) - On the chromatographie separation of glycerophospholipides.
Biochem. J., 1955, 60, (353-363).
- 287 - PHILLIPS (G.B.) - The isolation and quantitation of the principle phospholipid components of human serum using chromatography on silicic acid.
B.B.A., 1958, 29, (594-602).
- 288 - HANAHAN (D.J.), RODBELL (M.) and TURNER (L.D.) - Enzymatic formation of monopalmitoleyl and monopalmitoyllecithin (lysolecithins).
J. Biol. Chem., 1956, 206, (431-441).
- 289 - MOORE (J.H.) and WILLIAMS (D.L.) - A time study of the hydrolysis of lecithin by snake venom phospholipase A.
B.B.A., 1963, 70, (348-351).
- 290 - WOODHOVR (A.F.) and JENSEN (K.E.) - Adsorption characteristics of Influenza viruses to cholesterol and fatty acids.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1959, 100, (561-564).
- 291 - YOUNGNER (J.S.) and NOLL (H.) - Virus lipid interaction. I - Concentration and purification of viruses by adsorption to a cholesterol column and studies of the biological properties of lipid adsorbed virus.
Virology, 1958, 6, (157-180).

- 292 - NOLL (H.) and YOUNGNER (J.S.) - Virus lipid interactions. II - The mechanism of adsorption of lipophilic viruses to water insoluble polar lipids.
Virology, 1959, 8, (319-343).
- 293 - ROBINSON (N.) - Lysolecithin.
J. Pharm. and Pharmacol., 1961, 13, (321-354).
- 294 - GOTTFRIED (E.L.) and RAPPORT (M.M.) - The Biochemistry of plasmalogens - II - Hemolytic activity of some plasmalogens derivatives.
J. Lipid Research, 1963, 4, (57-62).
- 295 - GOTTFRIED (E.L.) and RAPPORT (M.M.) - Biochemistry of plasmalogens. I - Isolation and characterisation of phosphatidal choline, a pure native plasmalogen.
J. Biol. Chem., 1962, 237, (329-333).
- 296 - FONTANGES (R.), COEUR (P.), DENIEL (Y.) et COLOBERT (L.) - Dégénération de l'ovolécythine en présence de silice.
Bulletin Soc. Chimie Biol., 1965, sous presse.
- 297 - FROMMHAUSEN (L.H.), KNIGHT (C.A.) and FREEMAN (N.K.) - The ribonucleic acid, lipid and polysaccharide constituents of influenza virus preparation.
Virology, 1959, 8, (176-97).
- 298 - ARMBRUSTER (O.) und BEISS (U.) - Die untersuchungen der Phosphatidkomponenten von Viren der Influenza Gruppe.
Z. Naturforsch., 1958, 13b, (75-79).
- 299 - NEURATH (A.R.) - Investigations on β -naphthyl esterase and aminopeptidase activity of Sendai virus preparations and its identity with haemolysin.
Acta Virologica, 1964, 8, (191).
- 300 - STICKL (H.) - Hämolyisierende faktoren bei Influenza A - und Mumps virus.
Klin. Wschr., 1963, 41, (967-968).

CHAPITRE II

- 301 - ZWARTOUW (H.T.), WESTWOOD (J.C.N.) and APPLEYARD (G.) - Purification of Pox viruses by density gradient centrifugation.
J. Gen. Microbiol., 1962, 29, (523-529).
- 302 - SZYBALSKI (W.) - Sampling of virus particles and macromolecules sedimented in an equilibrium density gradient.
Experientia, Suisse, 1960, 16, (164).

- 303 - BARRY (R.D.) - Equilibrium sedimentation of influenza virus in cesium chloride density gradients.
Austr. J. Exp. Biol., 1960, 38, (499-508).
- 304 - STENBACK (W.A.) and DURAND (D.P.) - Host influence on the density of NDV.
Virology, 1963, 20, (545-551).
- 305 - CRAWFORD (L.V.) - A study of the Rous sarcoma virus by density gradient centrifugation.
Virology, 1960, 12, (143-153).
- 306 - SCHLUEDERBERG (A.E.) - Density gradient analysis of measles virus hemagglutinin and hemolysin.
Fed. Proc., 1962, 21, (455).
- 307 - MESELSOHN (M.), STAHL (F.W.) and VINOGRAD (J.) - Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1957, 43, (581-588).
- 308 - SOKOL (F.) - Heterogeneity of NDV particles with respect to their hemolytic activity.
Virology, 1963, 1, (126-128).
- 309 - MARTIN (R.G.) and AMES (B.N.) - A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : Application to protein mixtures.
J. Biol. Chem., 1961, 236, (1372-1379).
- 310 - Mac CREA (J.F.), EPSTEIN (R.S.) and BARRY (W.H.) - Use of potassium tartrate for equilibrium density gradient centrifugation of animal viruses.
Nature, 1961, 189, (220-221).
- 311 - OROSZLAN (S.I.), RIZVI (S.), O'CONNOR (T.E.) and MORA (P.T.) - Use of synthetic polyglucose for density gradient centrifugation of viruses.
Nature, 1964, 202, (780-781).
- 312 - NEURATH (A.R.) and SOKOL (F.) - Association of Myxoviruses with an adenosine diphosphatase, adenosine triphosphatase, as revealed by chromatography on DEAE - cellulose and by density gradient centrifugation.
Zeit. Naturforsch., 1963, 186, (1050-1052).
- 313 - NEURATH (A.R.) - DEAE - cellulose chromatography and density gradient centrifugation of egg - grown Sendai virus.
Acta Virologica, 1963, 7, (393-396).
- 314 - BRITTEN (R.J.) and ROBERTS (R.B.) - High resolution density gradient sedimentation analysis.
Science, 1960, 131, (32-33).

- 315 - DEMONT (G.), BERKALOFF (A.) et COLOBERT (L.) - Manifestations cytologiques de l'infection des cellules KB par Myxovirus parainfluenzae I.
Ann. Inst. Pasteur, 1963, 104, (26-42).
- 316 - MATSUMOTO (T.) and MAENO (K.) - Multiplication of HVJ in mouse lung cell culture and its variation.
7 th General Congress of Japanese Virologists, in Tokyo, 1959.
- 317 - ISHIDA (N.) and HOMMA (M.) - A variant of Sendai virus, infectious to egg embryos but not to L cells. III - Growth characteristics of myxovirus in tissue culture.
Tohoku J. Exp. Med. Jap., 1960, 73, (56-59).
- 318 - ISHIDA (N.) and HOMMA (M.) - Host controlled variation observed with Sendai virus, grown in mouse fibroblast (L) cells.
Virology, 1961, 14, (486-488).
- 319 - HOMMA (M.) - A particular binding of L cell grown Sendai virus by host L cells.
Tohoku J. Exp. Med., 1961, 73, (215-218).
- 320 - HOSAKA (Y.) - Characteristics of growth HVJ in PS cells.
Biken's J., 1962, 5, (121-125).
- 321 - NEURATH (A.R.) - Separation of a haemolysin from myxoviruses and its possible relationship to normal chorioallantoic membrane cells.
Acta Virologica, 1964, 8, (154-162).

CHAPITRE III

- 322 - STONE (J.D.) - Tryptic inactivation of the receptor destroying enzyme of V. cholerae and of the enzyme activity of influenza virus.
Austr. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1949, 27, (229-244).
- 323 - HOYLE (L.) and DAVIES (S.P.) - Aminoacid composition of the protein components of influenza virus A.
Virology, 1961, 13, (53-57).
- 324 - CLEELAND (R.) and SUGG (J.Y.) - Effect of trypsin on a susceptible strain of influenza A virus.
J. Immun., 1960, 85, (539-545).
- 325 - CLEELAND (R.) and SUGG (J.Y.) - Inactivation of hemagglutinating capacity of type A influenza virus by trypsin treatment.
Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 1963, 112, (913-917).

- 326 - MERRILL (M.H.) - Effect of purified enzymes on viruses and gram negative bacteria.
J. Exptl. Med., 1936, 64, (19-28).
- 327 - GRESSER (I.) and ENDERS (J.F.) - The effect of trypsin on representative myxoviruses.
Virology, 1961, 13, (420-426).
- 328 - SUGG (J.Y.) and CLEELAND (R.) - Differences in trypsin susceptibility among influenza viruses and relationship of the susceptibility to the antigenic or subtype of the virus.
J. Immunol., 1962, 88, (369-376).
- 329 - EREMEYEV (G.V.) and ZINCHENKO (V.S.) - Effect of proteolytic enzyme on Sendai virus.
VIII ème Congrès Int. Microbiologie, 1962, D 26-13, (84).
- 330 - NEURATH (A.R.) - Effect of trypsin treatment on the haemolytic, haemagglutinating, neuraminidase and adenosine diphosphatase activities of Sendai virus.
Acta Virologica, 1963, 7, (490-497).
- 331 - FONTANGES (R.), GARRIGUE (J.) et COLOBERT (L.) - Effet de la trypsine sur les propriétés hémolytique et neuraminidasique de Myxovirus parainfluenzae I.
Ann. Inst. Pasteur, 1964, 106, (894-901).
- 332 - VALENTINE (R.C.) and ISAACS (A.) - The structure of viruses of the Newcastle disease - mumps - influenza (Myxovirus) group.
J. Gen. Microbiol., 1957, 16, (680-685).
- 333 - VALENTINE (R.C.) and ISAACS (A.) - The structure of influenza virus filaments and spheres.
J. Gen. Microbiol., 1957, 16, (195-204).

CHAPITRE IV

- 334 - CHU (L.W.) and MORGAN (H.R.) - ... II - Relation of hemagglutination virus elution and hemolysis.
J. Exp. Med., 1950, 91, (403-416).
- 335 - WILSON (D.E.) - The inactivation of Newcastle disease virus hemolysin antiserum and high energy electrons.
Proc. Soc. Exp. Biol., 1958, 99, (205-208).
- 336 - SOKOL (F.), BLASKOVIC (D.) and ROSENBERG (M.) - Subunits of Myxoviruses - I - Treatment of NDV, p. Infl. I, and mumps viruses with ether.
Acta Virologica, 1961, 5, (65-77).

- 337 - SOKOL (F.), BLASKOVIC (D.) and KRIZANOVA (O.) - ... II - Properties of haemagglutinins of NDV, p. Infl. I and mumps viruses. Acta Virologica, 1961, 5, (153-159).
- 338 - SOKOL (F.), BLASKOVIC (D.) and KRIZANOVA - LAUCIKOVA (O.) - Haemagglutinating subunits released from NDV, parainfl. I. and mumps virus by treatment with ether. Nature, 1961, 190, (834-835).
- 339 - SOKOL (F.) and NEURATH (A.R.) - Subunits of Myxoviruses - V - Inactivation of Sendai virus haemolysin by treatment with ether and the role of virus receptors in haemolysis. Acta Virologica, 1962, 6, (122-126).
- 340 - NEURATH (A.R.) - Changes in the haemolytic activity of Sendai virus after different chemical and physical treatments. Acta Virologica, 1964, 8, (143-154).
- 341 - HERMODSSON (S.) - Effect of ultrasonic vibration on the hemagglutinating activity of some para-influenza viruses. Nature, 1960, 188, (1214).
- 342 - HANNOUN (Cl.), PRUDHOMME (R.O.) et GIUNTINI (J.) - Action des Ultra-sons sur les propriétés biologiques du virus de la grippe. Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, (188-201).
- 343 - BUCKLAND (F.E.) and TYRRELL (D.A.J.) - A comparative study of virus haemagglutinins, the stability of haemagglutinins and red cell receptors, to certain physical and chemical treatments. J. Gen. Microbiology, 1963, 32, (241-253).
- 344 - MORGAN (H.R.) - Factors interfering with the hemolytic property of mumps virus. Proceed. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 77, (276-278).
- 345 - CSONKA (E.) and KOCH (A.) - Effects of formaldehyde on influenza virus. III - Effects on the virus as an antigen. Acta Microbiol. Acad. Sci. hungar, 1962, 9, (89-96).
- 346 - ANDREWS (C.H.) and HORSTMANN (D.M.) - The susceptibility of viruses to ethyl ether. J. Gen. Microbiol., 1949, 3, (290-297).
- 347 - DAVENPORT (F.M.), ROTT (R.) and SCHAFER (W.) - Physical and biological properties of influenza virus components obtained after ether treatment. J. Exp. Med., 1960, 112, (765-782).
- 348 - HOSAKA (Y.), HOSAKAWA (Y.) and FUKAI (K.) - A new device for preparing subunits of myxovirus. Biken's J., 1959, 2, (367-369).

- 349 - HOSAKA (Y.), HOSOKAWA (Y.) and FUKAI (K.) - Estimation of particle weights of Myxovirus antigens by the gel diffusion technique. Biken's J., 1960, 3, (351-353).
- 350 - CHOPPIN (P.W.) and STOECKENIUS (W.) - Interaction of ether disrupted Influenza A₂ virus with erythrocytes, inhibitors and antibodies. Virology, 1964, 22, (482-492).
- 351 - CHESERO (W.R.) and HEDRICK (L.R.) - Basis of shield formation in virus hemagglutination. J. of Bacter., 1957, 74, (286-291).
- 352 - CHESERO (W.R.) and HEDRICK (L.R.) - Comparison of the tendency to cling to glass and hemagglutination produced in erythrocyte suspensions by ferric chloride and by influenza virus. Nature, 1958, 182, (1164).
- 353 - SMITH (W.) - The action of bile salts on viruses. J. Path. and Bact., 1939, 48, (557-571).
- 354 - BURNET (F.M.) and LUSH (D.) - The action of certain surface active agents on viruses. Austr. J. Exp. Biol. and M. Sc., 1940, 18, (141-150).
- 355 - THEILER (M.) - Action of sodium desoxycholate on arthropod borne viruses. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1957, 96, (380-382).
- 356 - SUNAGA (H.), TAYLOR (R.M.) and HENDERSON (J.R.) - Comparative sensitivity of viruses to treatment with diethyl-ether and sodium deoxycholate. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1960, 2, (419-425).
- 357 - ANDERSON (S.G.) and ADA (G.L.) - Some aspects of the reaction between crude Murray Valley encephalitis (MVE) virus and deoxycholate. Virology, 1959, 8, (270-71).
- 358 - LAVER (W.G.) - Purification, N - terminal Amino Acid analysis, and disruption of an influenza virus. Virology, 1961, 14, (499-502).
- 359 - LAVER (W.G.) - The structure of Influenza Viruses. I - N-terminal amino-acid analyses. Virology, 1962, 18, (19-32).
- 360 - LAVER (W.G.) - The structure of Influenza viruses. Disruption of the virus particle and separation of neuraminidase activity. Virology, 1963, 20, (251-262).

- 361 - LAVER (W.G.) - Structural studies on the protein subunits from three strains of Influenza virus.
J. Mol. Biol., 1964, 9, (109-124).

T R O I S I E M E P A R T I E

- 362 - BLASKOVIC (D.), SOKOL (F.) and KOCISKOVA (D.) - Subunits of myxoviruses. III - Antigenic properties of NDV, p Influenzae I and mumps viruses of their hemagglutinins and "g Ag".
Acta Virologica, 1961, 5, (294-304).
- 363 - BELYAVIN (G.) - The mechanism of Influenza virus haemagglutination as a model of specific receptor adsorption.
J. Gen. Microbiol., 1963, 32, (15-17).
- 364 - ADA (G.L.) and LIND (P.E.) - Neuraminidase in the chorion allantois of the chick embryo.
Nature, 1961, 190, (1169-1171).
- 365 - ADA (G.L.) - Purification and properties of avian neuraminidase.
B.B.A., 1963, 73, (276-284).
- 366 - COOK (B.) and ADA (G.L.) - Neuraminidase in tissues of the chick embryo and chick.
B.B.A., 1963, 73, (454-461).
- 367 - DRZENIEK (R.) und ROTT (R.) - Abspaltung einer Neuraminidase haltigen Komponente aus Newcastle disease virus (NDV).
Z. Naturforsch., B, Dtsch., 1963, 18, (1127-1128).
- 368 - SETO (J.T.) - Sialidase activity of standard and incomplete virus.
B.B.A., 1964, 90, (420-422).
- 369 - JOHNSON (C.A.), PEKAS (D.J.) and WINZLER (A.J.) - Neuraminidases and influenza virus infection in embryonated eggs.
Science, 1964, 143, (1051-1052).
- 370 - KNIGHT (C.A.) - Viral Enzymes.
in Chemistry of viruses, Protoplasmatologia, Wien Springer Verlag, 1963, (28-31).
- 371 - PADGETT (B.L.) and WALKER (D.L.) - Enzymatic variants of influenza virus. III - Function of neuraminidase in the viral growth cycle.
J. of Bacteriology, 1964, 87, (363-369).
- 372 - HOYLE (L.) - The multiplication of influenza viruses in the fertile egg.
J. Hyg., 1950, 48, (277-297).

- 373 - BOGOCH (S.), GILFILLAN (R.F.) and EVANS (P.) - Sialoresponsin : Neuraminic acid containing substance (s) which accumulates in chorioallantoic fluid during the first minutes of virus infection. *Nature*, 1962, 196, (649-651).
- 374 - NEURATH (A.R.) - Interference by nonhaemolytic myxoviruses with haemolysis by Sendai virus. Fundamental relationships. *Acta Virologica*, 1962, 6, (412-420).
- 375 - NEURATH (A.R.) and SOKOL (F.) - Interference by nonhaemolytic myxoviruses with haemolysis by Sendai virus. *Acta Virologica*, 1962, 6, (531-539).
- 376 - MAYER (M.M.), CROFT (C.C.) and GRAY (M.M.) - Kinetic studies on immune hemolysis. A method. *J. Exp. Med.*, 1948, 88, (427-444).
- 377 - OKADA (Y.), SUZUCKI (T.) and HOSAKA (Y.) - Interaction between influenza virus and Ehrlich's tumor cells. Fusion phenomenon of Ehrlich's tumor cells by the action of HVJ Z strain. *Med. J. Osaka Univ.*, 1957, 7, (709-717).
- 378 - OKADA (Y.) - The fusion of Ehrlich's tumor cells caused by HVJ virus in vitro. *Biken's J.*, 1958, 1, (103-110).
- 379 - OKADA (Y.) - Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I - Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exper. cell. Res.*, 1962, 26, (98-107).
- 380 - OKADA (Y.) and TADOKORO (J.) - ... II - Quantitative analysis of giant polynuclear cell formation. *Exper. Cell. Res.*, 1962, 26, (108-118).
- 381 - OKADA (Y.) - ... III - Relationship between cell condition and fusion reaction or cell degeneration reaction. *Exper. cell. Res.*, 1962, 26, (119-128).
- 382 - OKADA (Y.) and TADOKORO (J.) - The distribution of cell fusion capacity among several cell strains or cells caused by HVJ. *Exper. cell. Res.*, 1963, 32, (417-430).
- 383 - HO (Y.D.) - Comparative investigations into the haemolytic activity of different variants of parainfluenza I virus. *Acta Virologica*, 1962, 6, (114-121).
- 384 - HO (Y.D.) and GORBUNOVA (A.S.) - Investigations into Syncytium formation in cultures of stable cell lines infected with Parainfluenzae I virus. I - Comparison of the syncytium forming ability of the Vladivostok and Japanese variants of virus and some other factors related to this phenomenon. *Acta Virologica*, 1962, 6, (193-201).

- 385 - HO (Y.D.) - ... II - Morphology of syncytium formation in tissue cultures and a hypothesis concerning its mechanism.
Acta Virologica, 1962, 6, (202-206).
- 386 - HENLE (G.), DEINHARDT (F.) and GIRARDI (A.) - Cytolytic effect of mumps virus in tissue cultures of epithelial cells.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1954, 87, (386-393).
- 387 - RUSSELL (P.K.) and MORGAN (H.R.) - Mumps viral cytolysin. I - Action on human epithelial cells in tissue culture.
J. Infect. Dis., 1959, 104, (38-40).
- 388 - BUKRINSKAYA (A.G.) et ZHDANOV (V.M.) - La formation de symplastes dans les cultures des tissus transplantables, infectés avec le virus Sendai. (en russe).
Vopr. Virusol., 1961, 7, (364-366).
- 389 - GORBUNOVA (A.S.), HO (Y.D.) and YERSHOW (F.I.) - Investigations into syncytium formation in cultures of stable cell lines infected with parainfluenzae I virus. III - Characteristics of syncytia formed during passaging of virus carrier cells.
Acta Virologica, 1963, 7, (308-315).
- 390 - GORBUNOVA (A.S.), HO (Y.D.) and YERSHOW (F.I.) - ... IV - Cytochemical studies on the formation of A and B type syncytia.
Acta Virologica, 1963, 7, (316-321).
- 391 - GRESSER (I.) - Induction by Sendai virus of non transmissible cytopathic changes associated with rapid and marked production of Interferon.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1961, 108, (303-307),
- 392 - SOKOL (F.), NEURATH (A.R.) and VILCEK (J.) - Formation of incomplete Sendai virus in embryonated eggs,
Acta Virologica, 1964, 8, (59-67).
- 393 - COLOBERT (L.) et FONTANGES (R.) - Obtention de souches non hémagglutinantes de Myxovirus.
C.R. Acad. Sciences, 1960, 250, (3238-3240).
- 394 - TADOKORO (J.) - Modified virus particles in indiluted passages of HVJ. I - The production of modified particles.
Biken's J., 1958, I, (III-II7).
- 395 - TADOKORO (J.) - ... II - The characteristics of modified particles.
Biken's J., 1958, I, (II8-II8).
- 396 - NEURATH (A.R.) - Nonhaemolytic particles produced during multiplication of Sendai virus in the embryonated eggs.
Acta Virologica, 1963, 7, (397-404).

- 397 - COLOBERT (L.) et BERKALOFF (A.) - Libération du virus Sendaï par des cellules porteuses d'une infection chronique
Ann. Inst. Pasteur, 1964, 105, (581 - 587).
- 398 - GIERER (A.) and SCHRAIM (G.) - Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus.
Nature, 1956, 177, (702).
- 399 - PORTOCALA (R.), BOERU (V.) and SAMUEL (I.) - The biosynthesis of Influenza virus from a ribonucleic acid extract from the virus.
C.R. Acad. Sciences, 1959, 249, (201-202).
- 400 - PORTOCALA (R.), BOERU (V.) and SAMUEL (I.) - Biosynthesis of Influenza virus starting from an ether phenol virus extract.
Acta Virologica, 1959, 3, (172-174).
- 401 - PORTOCALA (R.), DUMITRESCU (S.), IONESCU (N.I.), SAMUEL (I.) and BOERU (V.) - Reproduction of Influenza virus by means of viral ribonucleic acid. Morphological aspects of the produced virus.
Com. Acad. R.P.R., 1960, 10, (453-459).
- 402 - PORTOCALA (R.), BOERU (V.) et SAMUEL (I.) - Reconstitution du virus grippal à partir de l'acide ribonucléique viral. IV - Dosage de la ribonucléase chez les embryons d'âge différent. (en roumain).
Stud. Cerc. Inframicrobiol. Romîn, 1961, 12, (71-75).
- 403 - PORTOCALA (R.) et ANDREESCU (M.) - V. effet de la qualité du phénol sur l'activité de l'acide ribonucléique. (en roumain).
Stud. Cerc. Inframicrobiol. Romîn, 1961, 12, (77-78).
- 404 - PORTOCALA (R.), BOERU (V.), HARAGEA (S.), SAMUEL (I.) et IONESCU (N.I.) - VI - Analyse spectrographique de l'acide ribonucléique. (en roumain).
Stud. Cerc. Inframicrobiol. Romîn, 1961, 12, (303-307).
- 405 - PORTOCALA (R.), IONESCU (N.I.), DUMITRESCU (S.), BOERU (V.) et SAMUEL (I.) - VII - Aspect morphologique de l'acide ribonucléique. (en roumain).
Stud. Cerc. Inframicrobiol. Romîn, 1961, 12, (309-315).
- 406 - MAASSAB (H.F.) - An infectious ribonucleic acid derived from influenza infected cells.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1959, 45, (877-81).
- 43 ème Meeting of Amer. Assoc. of Immunol., Avril 1959.
- 407 - MAASSAB (H.F.) - Further studies on the infectivity of ribonucleic acid prepared from influenza - infected cells.
J. Immunol., 1963, 90, (265-270).
- 408 - SOKOL (F.) and SZURMAN (J.) - Isolation of ribonucleic acid from purified influenza virus preparation by phenol extraction.
Acta Virologica, 1959, 3, (175-180).

- 409 - ADA (G.L.), LIND (P.E.), LARKIN (L.) and BURNET (F.M.) - Failure to recover infective ribonucleic acid from myxovirus preparation. *Nature*, 1959, 184, (360-361).
- 410 - SZURMAN (J.) - Une tentative pour isoler l'acide ribonucléique à partir du liquide chorioallantoïque des embryons de poulet infectés par le virus grippal. (en polonais). *Med. dosw. Mikrobiol.*, 1960, 12, (175-181).
- 411 - SOKOL (F.) and SCHRAMBEK (S.) - An improved method for the isolation of ribonucleic acid from myxoviruses. *Acta Virologica*, 1964, 8, (193-199).
- 412 - WECKER (E.) - The extraction of infectious virus nucleic with hot phenol. *Virology*, 1959, 7, (241-243).
- 413 - SCHAFER (W.) - Some observations concerning the reproduction of RNA containing animal viruses. *Virus growth and Variation 9 ème Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 1959, (61-81).
- 414 - FAZEKAS DE St GROTH (S.) - Viroplexis, the mechanism of Influenza virus infection. *Nature*, 1948, 162, (294-295).
- 415 - DALES (S.) and CHOPPIN (P.W.) - Attachment and penetration of influenza virus. *Virology*, 1962, 18, (488-493).
- 416 - BERKALOFF (A.) et COLOBERT (L.) - Modification de l'ultrastructure de la membrane cytoplasmique des cellules de rein de veau infectées par Myxovirus influenzae B (souche Lee). *J. Microscopie*, 1963, 2, (57-70).
- 417 - THIERY (J.P.) et BERKALOFF (A.) - Ultrastructure du virus Sendai. Influence des conditions de préparation sur l'aspect des particules virales examinées en "coloration négative". *J. Microscopie*, 1963, 2, (539-548).
- 418 - BURNET (F.M.), Mc CREA (J.F.) and STONE (J.D.) - Modification of human red cells by virus action. I. The receptor gradient for virus action in human red cells. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 1946, 27, (228 - 236).
-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(par ordre alphabétique)

Le (ou les) numéros qui suit chaque nom d'auteur correspond à la référence bibliographique donnée dans le chapitre précédent).

A

- ACKERMANN (W.W.) - voir JENSEN (K.E.) - 50 .
 ADA (G.L.) - 131, 188, 191, 364, 365, 409.
 - v. ANDERSON (S.G.) - 357.
 - v. COOK (B.) - 366.
 - v. FRENCH (E.L.) 190.
 - v. GOTTSCHALK (A.) - 160.
 - v. LAVER (W.G.) - 193.
 AISTON (S.) - v. COX (H.R.) - 105.
 ALAIS (C.) - v. DUMAS (R.) - 174.
 ALBERTSSON (P.A.) - v. PHILIPSON (L.) - 89.
 ALLISON (A.C.) - v. KATES (M.) - 268, 269.
 AMES (B.N.) - v. MARTIN (R.G.) - 309.
 ANANTHANARAYAN (R.) - 34
 ANDERSON (S.G.) - 357.
 ANDERSON (T.F.) - v. LWOFF (A.) - 1.
 ANDO (T.) - v. SANO (T.) - 19.
 ANDREESCU (M.) v. PORTOCALA (R.) - 403.
 ANDREWS (B.E.) - v. COOK (M.K.) - 38.
 ANDREWES (C.H.) - 55, 56, 57, 58, 346.
 AOYAGI (T.) - v. NOLL (H.) - 194, 195.
 APPLEYARD (G.) - v. ZWARTOUW (H.T.) - 301.
 ARMBRUSTER (O.) - 298.
 - v. MATHEKA (H.D.) - 87.
 ATANASIU (P.) - 245.

B

- BAKOS (K.) - v. HERMODSSON (S.) - 242.
 BALDUCCI (M.) - v. BENEDETTO (A.) - 31.
 BANG (F.B.) - v. ANDREWES (C.H.) - 56.
 BARRY (G.T.) - 156.
 BARRY (R.D.) - 303.
 BARRY (W.H.) - v. Mac CREA (J.F.) - 310.
 BARUA (D.) - 97.
 - v. FAUCONNIER (B.) - 231.
 BASSET (J.) - v. ATANASIU (P.) - 245.

BEARD (D.) - v. CUNHA (R.) - 70.
- v. ECKERT (E.A.) - 200.
BEARD (J.W.) - v. LANNI (F.) - 71.
BEISS (U.) - v. ARMBRUSTER (O.) - 298.
BELL (J.A.) - v. CHANOK (R.M.) - 37.
BELYAVIN (G.) - 363.
BENEDETTO (A.) - 31.
BENEDICT (A.A.) - 101, 103.
BERKALOFF (A.) - 416.
- v. DEMONT (G.) - 315.
- v. THIERY (J.P.) - 417, v. COLOBERT (L.) - 397.
BERNHEIMER (A.W.) - 261.
BETAIL (G.) - v. NICOLI (J.) - 91.
BIRKUM (K.) - v. PETERSEN (S.) - 47.
BLASKOVIC (D.) - 109, 362.
- v. SOKOL (F.) - 336, 337, 338.
BLIX (G.) - 121, 175, 179.
BLOCK (R.J.) - 211.
BOERU (V.) - v. PORTOCALA (R.) - 399, 400, 401, 402, 404, 405.
BOGOCH (S.) - 373.
BOHNEL (E.) - v. COX (H.R.) - 105.
BONET-MAURY (P.) - 63.
BOSCHMAN (T.A.C.) - v. WALOP (J.N.) - 218.
BOSTICK (W.L.) - v. SIEGEL (B.V.) - 102.
BRAND (G.) - 93.
BRANDLY (C.A.) - v. MAC COLLUM (W.H.) - 244.
BRAUN (G.A.) - v. ZILLIKEN (F.) - 146, 147.
BRENNER (S.) - 6.
BRIODY (B.A.) - 198.
BRITTEN (R.J.) - 314.
BRONITKI (A.) - v. TARCHILA (D.) - 51.
BROSSMER (R.) - v. KUHN (R.) - 140, 141, 142, 143, 144.
BRUG (J.) - 167.
BUCKLAND (F.E.) - 94, 343.
BUGHER (J.C.) - v. PAMM (I.) - 201.
BUKRINSKAYA (A.G.) - 39, 42, 388.
- v. ZHDANOV (V.) - 41.
BURNET (F.M.) - 116, 204, 235, 236, 354, 400, 418
- v. ANDREWES (C.H.) - 56.
BUZZELL (A.) - 77.

C

CAPUTTO (R.) - v. CARUBELLI (R.) - 153.
CARSON (H.G.) - v. SOMMERVILLE (R.G.) - 24.
CARUBELLI (R.) - 153.
CATEIGNE (G.) - v. FAUCONNIER (B.) - 29.
CHABERT (A.) - 257.

CHANG (S.S.) - 35.
CHANOCK (R.M.) - 37.
 - v. COOK (M.K.) - 44.
CHEN (C.Y.) - v. CHANG (S.S.) - 35.
CHEN (F.P.) - v. BARRY (G.T.) - 110.
CHESBRO (W.R.) - 351, 352.
CHINN (H.T.) - v. POLLARD (M.) - 100.
CHOPPIN (P.W.) - 10, 350.
 - v. DALES (S.) - 415.
CHU (L.W.) - 72, 334.
CIRNARU (S.) - v. TARCHILA (D.) - 51.
CLARK (W.R.) - 149.
CLEELAND (R.) - 324, 325.
 - v. SUGG (J.Y.) - 328.
COCCUZA (G.) - 27.
COEUR (P.) - v. FONTANGES (R.) - 282, 296.
COLLIER (H.B.) - 259.
 - v. WILBUR (K.M.) - 258.
COLOEERT (L.) - 73, 206, 228, 229, 230, 393, 397
 - v. BERKALOFF (A.) - 416.
 - v. BETAÏL (G.) - 91.
 - v. CHABERT (A.) - 257.
 - v. DEMONT (G.) - 315.
 - v. FONTANGES (R.) - 17, 296, 331.
 - v. MATHIEU (P.) - 64.
 - v. REBEL (G.) - 281.
COMB (D.G.) - 171.
COOK (M.K.) - 38, 44, 366.
COOPER (L.Z.) - 61, 262.
CORNFORTH (J.W.) - 172, 173.
COX (C.D.) - 92.
COX (H.R.) - 105.
CRAWFORD (L.V.) - 305.
CREACH (O.) - v. MATHIEU (P.) - 64.
CROFT (C.C.) - v. MAYER (M.M.) - 376.
CRUTKSHANK (J.G.) - v. WATERSON (A.P.) - 60.
CSONKA (E.) - 345.
CUNHA (R.) - 70.
CURTAIN (C.C.) - 120, 202, 203.
 - v. PYE (J.) - 192.

D

DAINES (M.E.) - v. CORNFORTH (J.W.) - 172.
DALES (S.) - 415.
DAVENPORT (F.M.) - 347.
 - v. DRESCHER (J.) - 224.
DAVIES (S.P.) - v. HOYLE (L.) - 323.
DAVOLI (R.) - 75.

DEINHARDT (F.) - v. HENLE (G.) - 386.
DE MEIO (J.L.) - 46.
DEMONT (G.) - 315.
DENIEL (Y.) - v. FONTANGES (R.) - 296.
DEWITT (C.W.) - 157.
DICK (E.C.) - 43.
DIETRICH (F.) - v. SIEGERT (R.) - 28.
DINTER (Z.) - v. HERMODSSON (S.) - 242.
DOMONKOS (J.) - 274.
DORFMAN (A.) - 215.
DOUSTE BLAZY (L.) - 265.
DRESCHER (J.) - 222, 223, 224.
DRZENIEK (R.) - 367.
DUFFRENE (A.) - v. COLOBERT (L.) - 228, 229.
DUMAS (R.) - 174.
DUMITRESCU (S.) - v. PORTOCALA (R.) - 401, 405.
DURAND (D.P.) - v. STENBACK (W.A.) - 304.
DURRUM (E.L.) - v. BLOCK (R.J.) - 211.

E

ECKERT (E.A.) - 200.
EDIPIDES (T.) - v. ATANASIU (P.) - 245.
EDNEY (M.) - v. BURNET (F.M.) - 204.
ELMES (P.C.) - v. WHITE (J.C.) - 130.
ENDERS (G.) - v. SIEGERT (R.) - 32.
ENDERS (J.F.) - v. GRESSER (I.) - 327.
 - v. MORGAN (H.R.) - 233.
ENGLEY (F.B.) - v. POLLARD (M.) - 100.
EPSTEIN (R.S.) - v. MAC CREA (J.F.) - 310.
EREMEYEV (G.V.) - 329.
EVANS (P.) - v. BOGOCH (S.) - 373.

F

FAILLARD (H.) - v. KLENK - 134, 159.
FALKE (D.) - v. SIEGERT (R.) - 28.
FALKSVEDEN (L.G.) - v. NORRBY (E.) - 243.
FARNHAM (A.E.) - v. HORNE (R.W.) - 2.
FAUCONNIER (B.) - 29, 231, 232.
 - v. BARUA (D.) - 97.
FAZEKAS DE SAINT GROTH (S.) - 414.
FIRTH (M.E.) - v. CORNFORTH (J.W.) - 173.
FOLCH (J.) - 283.
FONTANGES (R.) - 17, 99, 282, 296, 331.
 - v. CHABERT (A.) - 257.
 - v. COLOBERT (L.) - 73, 206, 228, 229, 230, 393.
 - v. MATHIEU (P.) - 64.
 - v. REBEL (G.) - 281.

FOX (N.H.) - v. COOK (M.K.) - 38.
FRANK (H.) - v. ROTT (R.) - 13.
FRANKLIN (R.M.) - 270, 271.
FREEMAN (N.K.) - v. FROMMHAGEN (L.H.) - 98, 297.
- v. SIEGEL (B.V.) - 102.
FRENCH (E.L.) - 190.
- v. ADA (G.L.) - 188, 191.
FRICK (G.) - v. PHILIPSON (L.) - 89.
FRIOLET (B.) - v. SIEGERT (R.) - 28.
FRISCH-NIGGEMEYER (W.) - 107.
FROMMHAGEN (L.H.) - 82, 98, 297.
FROTHINGHAM (T.E.) - 33.
FUKAI (K.) - 237.
- v. HOSAKA (Y.) - 11, 14, 348, 349.
FUKUMI (H.) - 20, 40.
- v. NISHIKAWA (F.) - 21.
FULTON (F.) - v. TAVERNE (J.) - 104.

G

GARDNER (P.J.) - 23, 275.
- v. WHITE (G.B.R.) - 25.
GARRIGUE (J.) - v. FONTANGES (R.) - 17, 331.
GERNGROSS (O.G.) - v. GORBUNOVA (A.S.) - 52.
GIERER (A.) - 398.
GILFILLAN (R.F.) - v. BOGOCH (S.) - 373.
GIRARDI (A.) - v. HENLE (G.) - 386.
GIRI (K.V.) - v. SAROJA (K.) - 210.
GIUNTINI (J.) - v. HANNOUN (C.) - 342.
GNORIZOVA (V.M.) - v. GORBUNOVA (A.S.) - 52.
GOLD (E.R.) - 96.
GOLYGINA (L.A.) - v. ZHDANOV (V.M.) - 53.
GORBUNOVA (A.S.) - 52, 389, 390.
- v. BUKRINSKAYA (A.G.) - 42.
- v. HO (Y.D.) - 54, 384, 385.
GOTTFRIED (E.L.) - 294, 295.
GOTTSCHALK (A.) - 117, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 132, 133, 138,
160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 176, 208.
- v. ADA (G.L.) - 131.
- v. BLIX (G.) - 175.
- v. CORNFORTH (J.W.) - 172, 173.
- v. GRAHAM (E.R.B.) - 137.
GRAHAM (E.R.B.) - 137.
- v. GOTTSCHALK (A.) - 126.
GRANOFF (A.) - 247, 248.
GRAY (M.M.) - v. MAYER (M.M.) - 376.
GRESSER (I.) - 327, 391.
GROSSGEBAUER (K.) - v. SCHMIDT (B.) - 88.
GYORGY (P.) - v. ZILLIKEN (F.) - 139, 146, 147.

H

- HAMAR (M.) - 15.
HAMON (V.) - v. LECOMTE DU NOUY (P.) - 207.
HANAHAN (D.J.) - 288.
HANIG (M.) - v. BRIODY (B.A.) - 198.
- v. BUZZEL (A.) - 77.
HANNOUN (C.) - 342.
HARAGEA (S.) - v. PORTOCALA (R.) - 404.
HARDY (P.H.) - 69.
HARTMANN (D.) - v. SCHMIDT (B.) - 88.
HASHIMOTO (Y.) - v. PIGMAN (W.) - 128.
- v. TSUIKI (S.) - 127.
HAYASHI (S.) - v. SASAHARA (J.) - 22.
HEATH (R.B.) - 36.
- v. STARK (J.E.) - 30.
HECHER (A.) - v. SIEGERT (R.) - 32.
HEDRICK (L.R.) - v. CHESBRO (W.R.) - 351, 352.
HEIMER (R.) - 129, 148.
HENDERSON (J.R.) - v. SUNAGA (H.) - 356.
HENLE (G.) - 386.
HENLE (W.) - v. GRANOFF (A.) - 247, 248.
- v. LIEF (F.S.) - 108.
HENNESSY (A.V.) - v. DAVENPORT (F.M.)
HERITIER (P.) - v. FONTANGES (R.) - 282.
HERMODSSON (S.) - 242, 341.
HESTRIN (S.) - 214.
HINUMA (Y.) - v. ISHIDA (N.) - 48.
HIRASAWA (N.) - v. SASAHARA (J.) - 22.
HIRST (G.K.) - 83, 113, 114, 115.
HO (Y.D.) - 54, 256, 384, 383, 385.
- v. BUKRINSKAYA (A.G.) - 42, 389, 390.
HOMMA (M.) - 319.
- v. ISHIDA (N.) - 48, 317, 318.
- v. MAENO (H.) - 260.
HORNE (R.W.) - 2, 3, 4.
- v. BRENNER (S.) - 6.
- v. HOYLE (L.) - 9, 110, 111.
HORSFALL (P.L.) - 221.
- v. PERLMANN (G.E.) - 205.
- v. HARDY (P.H.) - 69.
- v. TAMM (I.) - 135.
HORSFALL (J.) - v. HIRST (G.K.) - 83.
- v. TAMM (I.) - 201.
HORSTMANN (D.M.) - v. ANDREWES (C.H.) - 346.
HOSAKA (Y.) - 11, 14, 252, 277, 278, 320, 348, 349.
- v. OKADA (Y.) - 377.
HOSHI (S.) - v. MAENO (H.) - 260.
HOSOKAWA (Y.) - v. HOSAKA (Y.) - 11, 348, 349.
HOWATSON (A.F.) - 7.

HOWE (C.) - 182.
HOYLE (L.) - 9, 110, 111, 112, 323, 372.
HUERNER (R.J.) - v. CHANOCK (R.M.) - 37.
HURRELL (J.M.W.) - v. WATERSON (A.P.) - 5.

I

IONESCU (N.I.) - v. PORTOCALA (R.) - 401, 404, 405.
INGRAHAM (J.S.) - 95.
ISAACS (A.) - v. VALENTINE (R.C.) - 332, 333.
ISHIDA (N.) - 48, 317, 318.
- v. KUROYA (M.) - 18.

J

JACOB (F.) - v. LWOFF (A.) - 1.
JACOBS (J.) - 216.
- v. WALOP (J.N.) - 218.
JACKSON (R.H.) - v. CLARK (W.R.) - 149.
JAMES (A.T.) - v. KATES (W.R.) - 268, 269.
JAYARAM PANIKER (C.K.) - v. ANANTHANARAYAN (R.) - 34.
JENSEN (K.E.) - 50.
- v. WOODHOVR (A.F.) - 290.
JOHNSON (C.A.) - 369.
- v. KATHAN (R.H.) - 184.
JUDE (A.) - v. BONET MAURY (P.) - 63.

K

KAHNKE (M.J.) - 246.
KARABATSOS (N.) - 241.
KATES (M.) - 268, 269.
KATHAN (R.H.) - 184, 185.
KATO (K.) - v. SASAHARA (J.) - 22.
KAWAMURA (K.) - 187.
KEMPF (J.E.) - v. TESS (B.R.) - 155.
KILHAM (L.) - 234.
KITAYAMA (T.) - v. FUKUMI (H.) - 20.
KLENK (E.) - 134, 158, 159, 181, 183.
- v. BLIX (G.) - 175.
KLEMPERER (H.G.) - 266.
KLIMENKO (S.M.) - v. ZHDANOV (V.M.) - 8.
KNIGHT (C.A.) - 267, 370.
- v. FROMM HAGEN (L.H.) - 82, 98, 297.
KOCH (A.) - v. CSONKA (E.) - 345.
KOCISKOVA (D.) - v. BLASKOVIC (D.) - 362.
KRIZANOVA (O.) - v. SOKOL (F.) - 337.
KRIZANOVA-LAUCIKOVA (O.) - v. SOKOL (F.) - 338.

KUDO (H.) - 84, 85.
KUHN (R.) - 140, 141, 142, 143, 144, 145.
KUMAGAI (T.) - v. SASAHARA (J.) - 22.
KUROYA (M.) - 18.

L

LANNI (F.) - 71, 76.
- v. ECKERT (E.A.) - 200.
LANNI (Y.T.) - v. LANNI (F.) - 76.
LARKIN (L.) - v. ADA (G.L.) - 409.
LAUCIKOVA (O.) - 154.
LAUENSTEIN (K.) - v. KLENK (G.) - 158.
LAVER (W.G.) - 193, 358, 359, 360, 361.
LEA (C.H.) - 286.
LECOMTE du NOUY (P.) - 207.
LEDERHILGER (G.) - v. MUSSGAY (M.) - 240.
LEE (H.H.) - v. PUCK (T.T.) - 264.
LEE (H.S.) - v. CHANG (S.S.) - 35.
LEE (Y.J.) - v. CHANG (S.S.) - 35.
LEES (M.) - v. FOLCH (J.) - 283.
LEMPFRID (H.) - v. KLENK (E.) - 134.
LEPINE (P.) - 74.
LEVINE (S.) - 220.
- v. SAGIK (B.P.) - 249.
LEVYANT (M.I.) - v. SMIRNOVA (G.A.) - 86.
LIEF (F.S.) - 108.
LIND (P.E.) - v. ADA (G.L.) - 191, 364, 409.
- v. GOTTSCHALK (A.) - 118.
LINDBERG (E.) - v. BLIX (G.) - 179.
LIPPELT (H.) - v. BRAND (G.) - 93.
LIPPI (M.) - v. BENEDETTO (A.) - 31.
LOCKYER (W.J.) - v. GOLD (E.R.) - 96.
LUDOWIEG (J.) - 215.
LUSH (D.) - v. BURNET (F.M.) - 354.
LWOFF (A.) - 1, 66, 67.
LWOFF (M.) - v. LWOFF (A.) - 66.

M

MAASSAB (H.F.) - 406, 407.
MAC COLLUM (W.H.) - 244.
MAC CREA (J.F.) - 310, v. BURNET (F.M.) - 418
MAC GRAW (J.C.) - v. REINHARD (K.R.) - 78.
MAC KINNEY (R.W.) - 45.
MACPHERSON (L.W.) - 250.
MADOFF (M.A.) - v. COOPER (L.Z.) - 262.

MAENO (H.) - 260.
- v. MATSUMOTO (T.) - 272, 316.
MANGALO (R.) - 263.
MARINETTI (G.V.) - v. MOBERLY (M.L.) - 276.
- v. SOULE (D.W.) - 279.
MARSCHALL (J.H.) - v. TAVERNE (J.) - 104.
MARTENSSON (E.) - 151.
MARTIN (R.G.) - 309.
MATHEKA (H.D.) - 87.
MATHIEU (P.) - 64.
MATSUMOTO (T.) - 272, 316.
MAYER (M.M.) - 376.
MAYRON (L.W.) - 209, 219.
MEKLER (L.B.) - v. ZHANOV (V.M.) - 8.
MELVIN (E.H.) - v. SCOTT (T.A.) - 212.
MENTEN (M.L.) - v. MICHAELIS (L.) 217.
MERRILL (M.H.) - 326.
MESELSON (M.) - 307.
MEYER (K.) - v. HEIMER (R.) - 129, 142.
MICHAELIS (L.) - 217.
MILLER (H.K.) - 81.
MINUSE (E.) - v. JENSEN (K.E.) - 50.
MITCHELL (R.B.) - v. POLLARD (M.) - 100.
MITSUHASHI (S.) - v. MAENO (H.) - 260.
MOBERLY (M.L.) - 276.
MOGABGAB (W.J.) - v. DICK (E.C.) - 43.
MOHR (E.) - v. SCHRAMM (G.) - 189.
MOORE (J.H.) - 289.
MORA (P.T.) - v. OROSZLAN (S.I.) - 311.
MORGAN (H.R.) - 233, 344.
- v. RUSSELL (P.K.) - 387.
- v. CHU (L.W.) - 72, 334.
- v. GARDNER (B.J.) - 275.
- v. MOBERLY (M.L.) - 276.
- v. MORIMOTO (M.) - 273.
- v. SOULE (D.W.) - 279.
MORIMOTO (M.) - 273.
MUENCH (H.) - v. REED (L.J.) - 62.
MUNEKATA (K.) - v. SASAHARA (J.) - 22.
MURPHY (J.S.) - v. CHOPPIN (P.W.) - 10.
MUSSGAY (M.) - 240.

N

NAKAGAWA (I.) - v. SANO (T.) - 19.
NAUMOVA (V.C.) - v. ZHDANOV (V.M.) - 8.
NELSON (N.) - 213.

NEURATH (A.R.) - 49, 251, 253, 254, 299, 312, 313, 321, 330, 340,
374, 375, 396.
- v. SOKOL (F.) - 339, 392.
NICOLI (J.) - 91.
NIITSU (I.) - v. SANO (T.) - 19.
NISHI (Y.) - v. HOSAKA (Y.) - 14.
NISHIKAWA (F.) - 21.
- v. FUKUMI (H.) - 20, 40.
NOLL (H.) - 194, 195, 292.
- v. YOUNGNER (J.S.) - 291.
NORRBY (E.) - 243.
NUMAZAKI (Y.) - v. ISHIDA (N.) - 48.

O

O'CONNOR (T.E.) - v. OROSZLAN (S.I.) - 311.
ODIN (L.) - v. BLIX (G.) - 179.
OKADA (Y.) - 377, 378, 379, 380, 381, 382.
OKONOGI (T.) - v. MAENO (H.) - 260.
ORLANDO (J.) - v. NOLL (H.) - 194, 195.
OROSZLAN (S.I.) - 311.
OXANIWA (A.) - v. SASAHARA (J.) - 22.

P

PADGETT (B.L.) - 371.
PAERELS (G.B.) - v. BRUG (J.) - 167.
PALLANSCH (M.J.) - v. CLARK (W.R.) - 149.
PARROTT (R.H.) - v. CHANOCK (R.M.) - 37.
PARSONS (E.A.) - v. TURNER (J.C.) - 280.
PEKAS (D.J.) - v. JOHNSON (C.A.) - 369.
PERLMANN (G.E.) - 205.
PERRY (B.T.) - v. GOTTSCHALK (A.) - 119.
PETERSEN (S.) - 47.
PETO (S.) - v. HEATH (R.B.) - 36.
- v. STARK (J.E.) - 30.
PETRESCU (A.) - v. TARCHILA (D.) - 51.
PHILIPSON (L.) - 89.
PHILLIPS (G.B.) - 287.
PICKELS (E.G.) - v. HIRST (G.K.) - 113.
PIGMAN (W.) - 128.
- v. TSUIKI (S.) - 127.
PIRTLE (E.C.) - v. COX (C.D.) - 92.
POLLARD (M.) - 100.
POLLEY (J.R.) - 90.
POPENOE (E.A.) - 180.

PORTOCALA (R.) - 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405.
PRUDHOMME (R.O.) - v. HANNOUN (C.) - 342.
PUCK (T.T.) - 264.
 - v. LEVINE (S.) - 220.
PYE (J.) - 192.
 - v. CURTAIN (C.C.) - 120.
 - v. LAVER (W.G.) - 193.

R

RAAL (A.) - v. MARTENSSON (E.) - 151.
RAFELSON (M.E.) - 196.
 - v. MAYRON (L.W.) - 219.
 - v. WILSON (V.W.) - 197.
RAPPORT (M.M.) - v. GOTTFRIED (E.L.) - 294, 295.
RAYNAUD (M.) - v. MANGALO (R.) - 263.
REBEL (G.) - 281.
REDA (I.M.) - v. ROTT (R.) - 12.
REDMOND (R.F.) - v. POLLARD (M.) - 100.
REED (L.J.) - 62.
REIMOLD (G.) - v. VIVELL (O.) - 26.
REINHARD (K.R.) - 78.
RHODES (D.N.) - v. LEA (C.H.) - 286.
RITOVA (V.V.) - v. ZHDANOV (V.M.) - 53.
RIVERS (T.M.) - v. HIRST (G.K.) - 83.
RIZVI (S.) - v. OROSZLAN (S.I.) - 311.
ROBERT (B.) - v. BRITTEN (R.J.) - 314.
 - v. MAYRON (L.W.) - 219.
ROBINSON (N.) - 293.
ROCCUZO (M.) - v. COCCUZA (G.) - 27.
RODBELL (M.) - v. HANAHAN (D.J.) - 288.
ROSE (H.M.) - v. HOWE (C.) - 182.
ROSEMAN (S.) - v. COMB (D.G.) - 171.
ROSENBERG (M.) - v. HAMAR (M.) - 15.
 - v. SOKOL (F.) - 336.
ROTHSCHILD (L.) - v. TARCHILA (D.) - 51.
ROTT (R.) - 12, 13.
 - v. DAVENPORT (F.M.) - 347.
 - v. DRZENIEK (R.) - 367.
ROWE (J.A.) - v. DEWITT (C.W.) - 157.
ROWE (W.P.) - v. CHANOCK (R.M.) - 37.
RUSSELL (P.K.) - 387.

S

SAGIK (B.P.) - 249.
 - v. LEVINE (S.) - 220.
SAMUEL (I.) - v. PORTOCALA (R.) - 399, 400, 401, 402, 404, 405.

SANO (T.) - 19.
SANYAKORN (C.K.) - v. FROTHINGHAM (T.E.) - 33.
SAROJA (K.) - 210.
SASAHARA (J.) - 22.
SATO (S.) - 238.
SCHAFER (W.) - 413.
 - v. ROTT (R.) - 13.
 - v. DAVENPORT (F.M.) - 347.
SCHLESINGER (R.W.) - v. MILLER (H.K.) - 81.
SCHLUEDERBERG (A.E.) - 306.
SCHMIDT (B.) - 88.
SCHMIDT (E.) - 150.
SCHMIDT (G.) - 225.
SCHNEIDER (L.) - v. HOWE (C.) - 182.
SCHNEIR (M.) - v. RAFELSON (M.E.) - 196.
SCHRAMEK (S.) - v. SOKOL; (F.) - 411.
SCHRAMM (G.) - 189.
 - v. GIERER (A.) - 398.
SCHREIR (C.) - 226.
SCOTT (T.A.) - 212.

SERVANT (P.) - v. BONET-MAURY (P.) - 63.
SETO (J.T.) - 368.
SHIRATORI (T.) - v. KUROJA (M.) - 18.
SIEGEL (B.V.) - 102.
SIEGERT (R.) - 28, 32.
SILVER (R.K.) - v. ZILLIKEN (F.) - 139.
SIMPSON (R.E.H.) - v. WHITE (G.B.R.) - 25.
SMIRNOVA (G.A.) - 86.
SMITH (W.) - 353.
SOHLER (R.) - v. LEPINE (P.) - 74.
SOKOL (F.) - 308, 336, 337, 338, 392, 408, 411.
 - v. BLASKOVIC (D.) - 362.
 - v. NEURATH (A.R.) - 253, 254, 312, 375.
SOMMERVILLE (R.G.) - 24.
SOULE (D.W.) - 279.
STACEY (M.) - 178.
STAHL (E.) - 285.
STAHL (E.) - v. MESELSON (M.) - 307.
STANLEY (G.H.S.) - v. FOLCH (J.) - 283.
STARK (J.E.) - 30.
STEEVALSAN (T.) - v. VEERARAGHAVAN (N.) - 79, 80.
STEFANOV (S.B.) - 16.
STENBACK (W.A.) - 304.
STICKL (H.) - 300.
STOECKENIUS (W.) - v. CHOPPIN (P.W.) - 10, 350.
STOFFEL (W.) - v. KLENK (E.) - 181.
STOLL (R.D.) - v. LEA (C.) - 286.
STONE (J.D.) - 322.
 - v. BURNET (F.M.) - 418

SUGG (J.Y.) - 328.
- v. CLEELAND (R.) - 324, 325.
SUNAGA (H.) - 356.
SUZUCKI (T.) - v. FUKAI (K.) - 237.
- v. OKADA (Y.) - 377.
SVEDMYR (A.) - 68.
SVENNERHOLM (E.) - 170.
SVENNERHOLM (L.) - 136, 168, 169.
- v. MARTENSSON (E.) - 151.
- v. SVENNERHOLM (E.) - 170.
SWAIN (R.H.A.) - v. MACPHERSON (L.W.) - 250.
SZURMAN (J.) - 410.
- v. SOKOL (F.) - 408.
SZYBALSKI (W.) - 302.

T

TADOKORO (J.) - 394, 395.
- v. OKADA (Y.) - 380, 381, 382.
TAMM (I.) - 135, 201.
- v. PERLMANN (G.E.) - 205.
TARCHILA (D.) - 51.
TAVERNE (J.) - 104.
TAYLOR (R.M.) - v. SUNAGA (H.) - 356.
TESS (B.R.) - 155.
THEILER (M.) - 355.
THIBON (M.) - v. FAUCONNIER (B.) - 29.
THIELE (C.W.) - 284.
THIERY (J.P.) - 417.
TISCHER (I.) - 186, 227.
TOKES (Z.A.) - v. MAYRON (L.W.) - 209.
TOVEY (G.T.) - v. GOLD (E.R.) - 96.
TRUCCO (R.E.) - v. CARUBELLI (R.) - 153.
TSAI (T.H.) - v. BARRY (G.T.) - 156.
TSUIKI (S.) - 127.
TURNER (H.C.) - v. COOK (M.K.) - 38.
TURNER (J.C.) - 280.
TURNER (L.D.) - v. HANAHAN (D.J.) - 288.
TYRRELL (D.A.J.) - v. BUCKLAND (F.E.) - 343.
- v. HEATH (R.B.) - 36.
- v. KATES (M.) - 268, 269.

U

UHLENBRUCK (G.) - v. KLENK (E.) - 183.

V

VALENTINE (R.C.) - 332, 333.
VAN DER SCHEER (J.) - v. COX (H.R.) - 105.
VAN KEMPEN (E.J.) - v. ZIJLSTRA (X.G.) - 255.
VEERARAGHAVAN (N.) - 79, 80.
VENKATARAMAN (R.) - v. SAROJA (K.) - 210.
VILCEK (J.) - v. SOKOL (F.) - 392.
VINOGRAD (J.) - v. MESELSON (M.) - 307.
VIVELL (O.) - 26.

W

WAGLEY (P.F.) - v. MORGAN (H.R.) - 233.
WALKER (D.L.) - v. DE MEIO (J.L.) - 46.
- v. PADGETT (B.L.) - 371.
WALOP (J.N.) - 218.
- v. JACOBS (J.) - 216.
WARREN (L.) - 65.

WATERSON (A.P.) - 5, 59, 60.
- v. HORNE (R.W.) - 2, 3.
- v. HOYLE (L.) - 9, 110, 111.
- v. ROTT (R.) - 12.
WECKER (E.) - 412.
WEIL (M.L.) - v. CUNHA (R.) - 70.
WEINSTEIN (L.) - v. COOPER (L.Z.) - 262.
WEISS (L.) - 152.
WERNER (G.H.) - v. ZILLIKEN (F.) - 139.
WERNER (I.) - v. BLIX (G.) - 177, 179.
WESTWOOD (J.C.N.) - v. ZWARTOUW (H.T.) - 301.
WHITE (G.B.R.) - 25.
WHITE (J.C.) - 130.
WHITLEY (W.) - v. WHITE (J.C.) - 130.
WHITMORE (G.F.) - v. HOWATSON (A.F.) - 7.
WILBUR (K.M.) - 258.
WILDY (P.) - v. HORNE (R.W.) - 2, 4.
WILLIAMS (D.L.) - v. MOORE (J.H.) - 289.
WILSON (D.E.) - 335.
WILSON (V.W.) - 197.
- v. RAFELSON (M.E.) - 196.
WINZLER (A.J.) - v. JOHNSON (C.A.) - 369.
- v. KATHAN (R.H.) - 184, 185.
- v. MAYRON (L.W.) - 219.
WITTER (R.F.) - v. MOBERLY (M.L.) - 276.
WOODHOVR (A.F.) - 290.
WOOLEY (D.W.) - 199.

Y

YAMAMOTO (Y.) - v. SASAHARA (J.) - 22.
YERSHOW (F.I.) - v. GORBUNOVA (A.S.) - 389, 390.
YOSHIDA (M.) - 239.
YOSHIOKA (H.) - v. VIVELL (O.) - 26.
YUGNER (J.S.) - 291.
 - v. NOLL (H.) - 292.
YUKINO (H.) - v. SATO (S.) - 238.

Z

ZHDANOV (V.M.) - 8, 41, 53.
 - v. BUKRINSKAYA (A.G.) - 388.
ZIJLSTRA (W.G. - 255.
ZILLIKEN (F.) - 139, 146, 147.
ZINCHENKO (V.S.) - v. EREMEYEV (G.V.) - 329.
ZUFFA (A.) - v. NEURATH (A.R.) - 49.
ZWARTOUW (H.T.) - 301.
ZWEIG (G.) - v. BLOCK (R.J.) - 211.

TABLE DES MATIERES

	pages
INTRODUCTION	3

PREMIERE PARTIE MISE AU POINT DES TECHNIQUES EXPERIMENTALES

CHAPITRE I. -DEVELOPPEMENT DE L'INFECTION A MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I EN OEUF DE POULE EMBRYONNE.....	II
I - Matériel et Méthodes.....	II
A - Le virus.....	II
B - Les conditions d'incubation.....	I4
C - Les méthodes de titrage.....	I5
II - Résultats.....	I7
A - Influence du degré hygrométrique pendant l'incubation.	I7
B - Influence de la température d'incubation.....	20
III - Discussion.....	20
Conclusion.....	26
CHAPITRE II. - INTERFERENCE D'UN INHIBITEUR AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I EN OEUF DE POULE EMBRYONNE.....	27
I - Techniques.....	27
A - Titrage du pouvoir inhibiteur de l'hémolyse.....	27
B - Titrage du pouvoir inhibiteur de l'hémagglutination...	30
C - Emploi du Receptor Destroying Enzyme pour détruire les inhibiteurs.....	32
D - Emploi de la trypsine pour détruire les inhibiteurs...	32
E - Emploi du periodate pour détruire les inhibiteurs.....	32
F - Action de la température sur les inhibiteurs.....	34

II - Résultats.....	34
A - Mise en évidence d'inhibiteurs dans les liquides embryonnaires en fonction de l'âge des embryons.....	34
B - Effet de la température, du periodate, du R.D.E., de la trypsine sur les propriétés d'inhibition de l'hémagglutination.....	35
C - Effet de la température, du periodate, du R.D.E., de la trypsine sur les propriétés d'inhibition de l'hémolyse.....	35
III - Discussion.....	38
Conclusion.....	39

CHAPITRE III. - TECHNIQUES DE PURIFICATION DES MYXOVIRUS ET METHODE
D'EXTRACTION DE L'HEMAGGLUTININE..... 41

I - Purification de Myxovirus parainfluenzae I par adsorp- tion-élution.....	43
II - La spectrographie infrarouge appliquée au contrôle de la purification de Myxovirus parainfluenzae I par ad- sorption-élution.....	45
A - Liquide allantoïque non centrifugé.....	47
B - Liquide allantoïque centrifugé.....	48
C - Liquide allantoïque infecté, purifié par double adsorption-élution sur hématies de veau formolées....	50
III - Purification de Myxovirus influenzae B par chroma- tographie frontale.....	51
IV - Technique d'extraction de l'hémagglutinine.....	52
Spectre infrarouge de l'hémagglutinine.....	54
Conclusion.....	55

CHAPITRE IV. - ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU VIRUS GRIPPAL PAR
LA TECHNIQUE DE VISCOSIMETRIE..... 57

I - Matériel et Techniques.....	64
A - Le viscosimètre.....	64

B - Le substrat, le mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf.....	65
C - Technique opératoire.....	66
II - Résultats.....	68
A - Action du pH.....	68
B - Action de la concentration virale.....	68
C - Action du calcium.....	68
D - Influence des lipides en solution.....	73
III - Discussion.....	74
CHAPITRE V. - METHODE DE TITRAGE DU POUVOIR NEURAMINIDASIQUE DE MYXOVIRUS INFLUENZAE B (souche Lee) ET DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I (souche Sendai).....	
I - Caractère de la cinétique d'hydrolyse de l'acide 3' lactose-lactaminique par Myxovirus Influenzae B.....	75
A - L'acide 3' lactose-lactaminique.....	75
B - Conditions expérimentales de l'étude de l'activité neuraminidasique.....	86
- Le substrat.....	86
- Solution tamponnée.....	86
- Le virus.....	86
- La réaction.....	86
C - Résultats.....	91
- Action du pH.....	91
- Influence de la concentration en substrat.....	91
- Influence de la concentration en virus.....	96
- Influence des produits de dégradation sur la cinétique d'hydrolyse de l'ALL.....	97
- Influence inhibitrice du cuivre.....	97
II - Caractères de la cinétique d'hydrolyse de l'A.L.L. par Myxovirus parainfluenzae I.....	98
III - Recherche du pouvoir neuraminidasique éventuel du li- quide allantoïque non infecté.....	98

IV - Activité neuraminidasique de Myxovirus Influenzae B sur le mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf.	I00
V - Cinétique de libération de l'acide sialique à partir du mucopolysaccharide de la glande sous-maxillaire de boeuf par Myxovirus parainfluenzae I.....	I04
VI - Activité neuraminidasique des souches A, A _I , A ₂ , de Myxovirus Influenzae sur le M.P.....	I04
VII - Discussion.....	I06
Conclusion.....	I08

CHAPITRE VI. - METHODE PHOTOMETRIQUE DE TITRAGE DU POUVOIR HEMAGGLUTINANT DES MYXOVIRUS.....	I09
I - Myxovirus Influenzae, type B.....	II0
A - Principe et dispositif expérimental.....	II0
B - Allure générale de la cinétique de sédimentation.....	II0
C - Interprétation théorique.....	II4
D - Relation entre la vitesse relative de sédimentation et la concentration en facteur d'hémagglutination....	II6
E - Recherche d'une unité conventionnelle d'hémagglutination.....	II6
F - Influence de la température.....	II8
II - Myxovirus parainfluenzae I (virus Sendaï).....	I20
Conclusion.....	I23

CHAPITRE VII. - METHODE DE TITRAGE DU POUVOIR HEMOLYTIQUE DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I.....	I25
I - L'hémolyse virale.....	I25
II - Etude cinétique de l'hémolyse provoquée par le virus Sendaï.....	I29
A - Relation entre la concentration d'hémoglobine libérée et le nombre d'hématies hémolysées.....	I29
B - Cinétique de l'hémolyse provoquée par le virus Sendaï en fonction de sa concentration.....	I30

C - Cinétique de l'hémolyse provoquée par une concentration donnée de virus en fonction de la concentration en hématies.....	I34
D - Cinétique de l'hémolyse provoquée par le virus en fonction de la nature des hématies.....	I36
III - Action du pH sur la réaction d'hémolyse.....	I38
IV - Action de la température sur la réaction d'hémolyse.....	I40
V - Discussion.....	I41
- Recherche d'une unité conventionnelle d'hémolyse.....	I41
- Mesure de l'activité hémolytique.....	I42

DEUXIEME PARTIE

RAPPORTS ENTRE LA STRUCTURE ET LES PROPRIETES BIOLOGIQUES.

CHAPITRE I. - HYPOTHESE DE LA NATURE PHOSPHATIDIQUE DE L'HEMOLYSINE

CHEZ MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I.....	I45
I - Etude théorique des cinétiques d'hémolyse.....	I48
II - Matériel et méthodes d'étude des lysophosphatides.....	I51
A - Méthode de microspectrographie infrarouge applicable aux lipides.....	I51
a) Méthode d'élution des taches de chromatographie en couche mince.....	I51
b) Technique de microspectrographie infrarouge.....	I52
c) Résultats.....	I56
B - Ovolécithine.....	I58
C - Lysolécithine.....	I59
D - Acides gras.....	I60
E - Méthodes d'hémolyse.....	I60
III - Résultats de l'étude de l'hémolyse provoquée par les lysophosphatides.....	I63
A - Action de la température sur le pouvoir hémolytique de la lysolécithine.....	I63

B - Hémolysé en fonction de la concentration en lyso- lécithine.....	I65
C - Action de la trypsine sur la lysolécithine.....	I65
D - Action de l'éther deperoxydé sur la lysolécithine....	I66
E - Hémolysé comparée des hématies humaines et des hématies de mouton sur la lysolécithine.....	I67
F - Inhibition de l'hémolysé due à la lysolécithine par l'ovolécithine.....	I68
G - Action de la température sur le pouvoir hémolysique des acides gras.....	I69
H - Cinétique d'hémolysé par le mélange lécithine, lyso- lécithine et acides gras.....	I70
I - Essai d'adsorption de la lysolécithine, de la lécithi- ne, des acides gras sur le virus Sendaï.....	I71
IV - Recherche de la lysolécithine sur les extraits lipidiques de Myxovirus parainfluenzae I.....	I73
V - Discussion.....	I75

CHAPITRE II. - RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE LES CARACTERES HEMAG-
GLUTINANT ET HEMOLYTIQUE DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I PAR LA CENTRI-
FUGATION EN GRADIENT DE DENSITE..... I81

I - Matériel et Méthodes.....	I83
II - Résultats.....	I87
A - Centrifugation des particules complètes provenant d'une culture sur oeufs embryonnés.....	I87
B - Centrifugation des particules virales préalablement broyées.....	I88
C - Centrifugation en gradient de densité des particules virales préalablement soumises à une série de congé- lations-décongelations.....	I89
D - Centrifugation de particules virales cultivées sur cellules KB.....	I91

E - Centrifugation de membranes allantôïques traitées par le desoxycholate de soude.....	I93
F - Recherche du titre infectieux des fractions I et II (fig. 70) recueillies après centrifugation en gradient de densité de particules broyées.....	I93
III - Discussion.....	I93

CHAPITRE III. - RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE LES PROPRIETES HEMOLY-
TIQUE ET NEURAMINIDASIQUE DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I PAR L'ETUDE
DE L'ACTION DE LA TRYPSINE.....

I - Matériel et Méthodes.....	I98
A - Trypsine.....	I98
B - Inhibiteur de la trypsine.....	I98
C - Effet de la trypsine.....	I98
II - Résultats.....	I99
A - Effet de l'alcool isopropylique.....	I99
B - Action du DFP en solution dans l'alcool isopropylique	I99
C - Action de la trypsine.....	I99
D - Influence de la concentration en trypsine.....	202
III - Discussion.....	202

CHAPITRE IV. - RECHERCHE D'UNE RELATION ENTRE LES SUPPORTS DES AC-
TIVITES HEMAGGLUTINANTE, HEMOLYTIQUE, NEURAMINIDASIQUE ET INFECTIEUSE
PAR L'ETUDE DE L'ACTION DE DIFFERENTS TRAITEMENTS PHYSIQUES OU CHI-
MIQUES.....

I - Effet de la congélation.....	209
A - Etude des propriétés hémagglutinante et hémolytique après un séjour de 18 heures à différentes tempéra- tures.....	209
B - Cinétique de l'hémolyse à la température de - 10°C...	210
C - Recherche de l'activité hémolytique après inoculation à des oeufs embryonnés de 9 jours, d'un liquide al- lantoïque inactivé partiellement ou totalement à la température de - 10°C.....	210

D - Recherche de l'activité neuraminidasique après stockage du liquide allantoïque infecté à la température de - 10°C.....	213
E - Effet de la congélation à la température de - 10°C...	215
F - Titres infectieux des liquides allantoïques conservés aux températures de + 4°C, - 10°C et - 30°C.....	216
G - Effet de la congélation à la température de - 70°C sur un lot de virus Sendaï conservé à - 10°C.....	216
H - Effet des congélations-décongélations sur différents lots récoltés après inoculation de liquides allantoï- ques infectés, mais plus ou moins inactivés par con- servation à la température de - 10°C.....	217
I - Effet de la congélation à la température de - 196°C..	219
J - Etude de la résistivité au cours des congélations....	219
II - Action du broyage sur les particules virales.....	224
III - Action de la température.....	226
IV - Effet de la dialyse.....	230
V - Action du rayonnement ultraviolet.....	232
VI - Action du méthanol.....	234
VII - Action du formaldéhyde.....	238
VIII - Action de l'éther.....	242
IX - Action des sels biliaires.....	245
A - Desoxycholate de soude.....	246
B - Glycocholate de soude.....	248
C - Taurocholate de soude.....	251
X - Discussion.....	253

TROISIEME PARTIE

Discussion générale.....	259
- Le support de l'activité hémagglutinante.....	259

- Le support de l'activité neuraminidasique.....	261
- Le support de l'activité hémolytique.....	265
- Le support du pouvoir infectieux.....	272

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- par ordre d'arrivée dans le texte.....	283
- par ordre alphabétique.....	318

- Table des matières.....	335
---------------------------	-----

DEUXIÈME THÈSE

DE L'UTILISATION
DU
SPECTRE INFRAROUGE
EN VUE DE L'IDENTIFICATION
DES
MICROORGANISMES

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :
Lyon, le 20 Mai 1965

le Recteur,
Président du Conseil de l'Université
P. LOUIS

